

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.O. 14612.



Articles principaux
recouvrant en partie

la THESE présentée
pour l'obtention

du grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES
à l'Université Pierre et Marie CURIE

par Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS

Sujet de la Thèse :

BIOACCUMULATION MINERALE, PURIQUE ET FLAVINIQUE

CHEZ LES INSECTES :

METHODES D'ETUDE - IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE

Soutenue le 30 janvier 1975

devant la Commission composée de :

R. COUTEAUX

Président

P. GALLE

Examineur

R. MARTOJA

-

C. NOIROT

-

J. RACADOT

-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Articles principaux
recouvrant en partie

la THESE présentée
pour l'obtention
du grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES
à l'Université Pierre et Marie CURIE

par Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS

Sujet de la Thèse :

BIOACCUMULATION MINERALE, PURIQUE ET FLAVINIQUE
CHEZ LES INSECTES :
METHODES D'ETUDE - IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE

Soutenue le 30 janvier 1975

devant la Commission composée de :

R. COUTEAUX	Président
P. GALLE	Examineur
R. MARTOJA	-
C. NOIROT	-
J. RACADOT	-



**ANALYSE CHIMIQUE
D'INCLUSIONS MINÉRALES
PAR SPECTROGRAPHIE
DES RAYONS X
ET PAR CYTOCHIMIE.**

APPLICATION A QUELQUES ORGANES
D'INSECTES ORTHOPTÈRES

Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS et Roger MARTOJA *

*Laboratoire d'Histopathologie des Insectes, Université Paris VI, 12, rue Cuvier, Paris (5°), et Laboratoire de Recherches de Cytopathologie Rénale, Hôpital Necker, Paris (15°) ***

INTRODUCTION

Chez tous les Insectes, des inclusions cristallines se présentant sous les formes les plus diverses et notamment celle de sphérocristaux, s'accumulent dans certains organes, soit tout au long du cycle vital, soit à des périodes déterminées de la vie. Si, dans ces concrétions, l'acide urique a été souvent mis en évidence, les sels minéraux, au contraire, n'ont été caractérisés que dans de rares cas. L'absence de recherches approfondies sur les accumulations ioniques des insectes pourrait être due à l'impossibilité d'appliquer des techniques chimiques à des organes petits, mal individualisés et d'accès malaisé aussi bien qu'à la difficulté d'interpréter

* Avec la collaboration technique de M^{mes} A. Anglo et C. Marcaillou.

** Adresse des auteurs.

des méthodes cytochimiques dont la spécificité a souvent été mise en doute. Seuls, les mouvements d'ions diffusibles ont récemment retenu l'attention des physiologistes.

Les possibilités nouvelles qu'offre l'analyse par spectrographie des rayons X sur pièces fixées (Galle, 1965) nous a incités à entreprendre l'étude des dépôts ioniques, cristallins ou non, conservés par la fixation histologique. Cette étude a été réalisée dans divers organes d'Orthoptères ; les résultats de l'analyse spectrographique ont été comparés à ceux des techniques cytochimiques ou microchimiques les plus courantes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les recherches ont porté sur les imago des espèces suivantes :

Célifères, Acridiens : *Locusta migratoria migratorioides* R. et F. et *Schistocerca gregaria* Försk.

Ensifères, Gryllides : *Gryllus bimaculatus* de Geer.

Tettigonides : *Ephippiger cunii* Bol., éventuellement *Decticus verrucivorus* L., *Pholidoptera griseoaptera* de Geer.

A l'exception des Tettigonides, récoltées dans la nature, les Insectes provenaient des élevages du laboratoire. Leur nourriture était strictement végétarienne. Les Acridiens étaient maintenus en phase grégaire.

Les abdomens des animaux ont été fixés pendant 24 heures au liquide de Carnoy (alcool, chloroforme, acide acétique) qui élimine les ions diffusibles, puis inclus à la paraffine et coupés à 7 μ .

1. L'analyse ionique par spectrographie des rayons X a été effectuée à la microsonde Cameca MS 46, avec une tension d'accélération de 15 Kv, un courant d'échantillon de 40 nA, un diamètre de sonde de 1 μ environ et 3 cristaux différents (quartz, K.A.P., P.E.T.).

Les coupes ont été collées sur un support de terphane carboné, séchées et déparaffinées par le toluène. La pulvérisation d'une couche métallique s'est avérée inutile.

Nous avons recherché les ions décelables par cytochimie (Ca, Mg, K, PO_4) ainsi que les ions Cl et Na récemment identifiés dans certains cristaux d'insectes. Dans le cas du phosphore, nous avons vérifié au préalable l'impossibilité de détection du phosphore organique dans les principaux organes, ce qui rend certaine la nature « minérale » de l'ion P décelé dans les conditions techniques de cette recherche.

Les analyses effectuées possèdent une valeur à la fois qualitative et comparative. En effet, les mesures ont été effectuées dans des conditions identiques : des coupes d'espèces différentes étalées sur un même support ont été analysées sans modification du réglage de la sonde. Ainsi ont pu être comparés non seulement des organes d'une même espèce, mais un même organe dans des espèces différentes. Toutefois, les enregistrements des raies caractéristiques n'étant pas effectuées avec le même cristal pour les divers ions, seules les teneurs en un même ion, peuvent être comparées.

Les résultats des mesures, portés sur les Figures 1 à 7, correspondent toujours aux valeurs moyennes de plusieurs enregistrements.

2. Les méthodes cytochimiques suivantes ont été appliquées * :

- détection du calcium : alizarine sulfonate de sodium à pH 4,5 (Mc Gee Russel) (Gabe, 1969) ;
- détection du magnésium : jaune titan (Broda) (Pearse, 1961) ;
- détection du potassium : réaction au cobalthexanitrite de sodium (Macallum). Les variantes décrites dans les traités d'histochemie concernent les ions diffusibles (Gabe, 1969) ; nous avons adapté celle de Crout et Jennings au potassium des cristaux, en omettant les particularités techniques que nécessite la fixation d'ions diffusibles ;
- détection des anions : substitution à l'argent (von Kossa) (Gabe, 1969) ; substitution au cobalt (Stoelzner) (Gabe, 1969) ;
- détection de l'acide urique : réduction du ferricyanure ferrique (Schmorl) (Pearse, 1961) ; réaction argentaffine au complexe d'argento-méthénamine (Gomori) (Gabe, 1969) ;
- détection des carbonates : méthode microchimique de Bunting (Ganter et Jollès, 1970).

3. Les préparations-témoins ont été réalisées par extraction des sels minéraux à l'acide nitrique en milieu aqueux ou alcoolique, et des urates par l'hydrate de pipérazine (Lison, 1960).

4. Les résultats démontrant que les structures étudiées contiennent toujours un mélange de cations, Ca, Mg et K, liés soit à des ions PO_4 , soit à de l'acide urique, il importe d'envisager le problème de la *spécificité* des techniques utilisées. Ce problème ne peut être résolu que par l'application de ces méthodes à des molécules ne comportant qu'un seul cation et un seul anion. Une étude préliminaire a donc été réalisée, par des tests pratiqués *in vitro* et *sur matériel biologique*.

In vitro, le réactif utilisé en cytochimie a été appliqué sur un papier à chromatographie imbibé d'un sel minéral et séché ; après achèvement de la réaction, le papier a été déshydraté et monté dans les mêmes conditions qu'une coupe histologique.

TESTS *in vitro*

	Von Kossa	Alizarine	Schmorl	Gomori
Phosphate de calcium	+	laque rouge	—	± (réduction très lente et faible)
Phosphate de magnésium	+	laque rouge		
Phosphate de potassium	+	laque orangée	—	
Urate de lithium	+		+ (réduction instantanée)	+ (réduction assez rapide à 37 °C)

* Nous n'indiquons que la référence bibliographique d'un traité récent dans lequel ces techniques sont exposées avec le maximum de détails.

Sur *matériel biologique*, nous avons appliqué les techniques cytochimiques à des sels formés artificiellement de la manière suivante : des coupes d'intestin de rat, fixées dans des conditions qui préservent les phosphatases alcalines ont été mises en incubation dans le mélange de Gomori pour la détection de ces activités enzymatiques ; au substrat du bain d'incubation ont été ajoutés, soit du nitrate de calcium, soit du nitrate de magnésium, soit du nitrate de potassium. Dans ces conditions, se sont formés des phosphates de calcium, magnésium ou potassium, sur lesquels les techniques cytochimiques ont été pratiquées. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

TESTS SUR MATÉRIEL BIOLOGIQUE

	Von Kossa	Stoelzner	Alizarine	Jaune titan	Cobalt hexanitrite	Gomori
Phosphate de calcium	+	+	+	—	—	—
Phosphate de magnésium	+	+	+	+	—	—
Phosphate de potassium	+	+	+	—	—	—
			(faible)			

Nos résultats confirment que les méthodes de substitution révèlent l'anion (phosphates, urates). L'alizarine donne une laque avec les trois cations étudiés, alors que le jaune titan est spécifique du magnésium. Dans la détection des urates, la méthode de Schmorl est plus spécifique que celle de Gomori, au moins *in vitro*, et en ce qui concerne la possibilité d'interférence avec des composés *inorganiques*.

RÉSULTATS

A. Données histologiques

Les organes que nous avons étudiés accumulent des ions sous forme de sphérocristaux ou de microcristaux*, ou bien, au contraire, sous une forme indécélable sans mise en œuvre de réactions cytochimiques. Certains tissus se chargeant de grains de pigments ont également retenu notre attention.

1. Corps gras

La présence d'urates dans le corps gras des Insectes est un fait bien connu (voir Wigglesworth, 1965). Chez la plupart des Orthoptères, ce

* Nous appelons « microcristaux » des cristaux trop petits pour que la forme puisse en être précisée.

déchet du métabolisme s'accumule sous forme de sphérocristaux, dans des cellules spéciales dont l'aspect morphologique varie selon les groupes (Pl. I, fig. *a* à *f*) (Martoja et Lauverjat, 1964). Les cellules à urates des Acridiens sont nombreuses et très ramifiées, leur corps cellulaire très petit ; la taille des cristaux n'excède pas 1μ . Les cristaux des Ensifères atteignent jusqu'à 7μ chez les Gryllides et les Tettigonides.

2. Appareil excréteur, ou tubes de Malpighi

Les tubes de Malpighi, très nombreux chez les Orthoptères, contiennent deux types de cellules, les cellules excrétrices et les mucocytes (Martoja, 1961). Les cellules excrétrices diffèrent, d'un groupe à l'autre, par plusieurs caractères, mais nous ne retiendrons ici que les différences concernant les sphérocristaux et les pigments. Les Gryllides sont les seuls Orthoptères dont les cellules excrétrices, surtout celles du segment moyen, renferment toujours un très grand nombre de sphérocristaux ; bon nombre de cristaux se trouvent en outre dans la lumière, notamment dans le segment proximal (Pl. III, fig. *b*). Les Acridiens sont dépourvus de cristaux visibles au simple examen histologique ; chez certains, tel *Locusta*, le cytoplasme contient de nombreux grains de pigments, alors qu'il en est dépourvu dans d'autres espèces, dont *Schistocerca* (Pl. III, fig. *d* ; Pl. IV, fig. *b*). Les Tettigonides représentent à cet égard un groupe très hétérogène ; dans certains genres abondent les sphérocristaux (*Pholidoptera*), dans d'autres les pigments (*Decticus*) ; l'appareil excréteur d'*Ephippiger*, pauvre en sphérocristaux et en pigments, représente un cas extrême.

Quant aux mucocytes, ils sont toujours dépourvus de sphérocristaux et de pigments.

3. Tégument

Dans les cellules hypodermiques, aucun cristal n'a été décrit à ce jour, au moins chez les Orthoptères. Seuls ont été signalés des grains de pigments, appartenant au groupe des ommochromes (Fuzeau-Braesch, 1960) (Pl. II, fig. *a*). Pourtant, l'examen au microscope polarisant de coupes non colorées révèle, dans l'hypoderme des régions latérales souples de l'abdomen d'*Ephippiger* (épiméroïdes et épisternoides), l'existence d'un très grand nombre de microcristaux biréfringents, emplissant la totalité du cytoplasme (Pl. I, fig. *g*, *h*). L'abondance des pigments rend impossible l'observation de tels cristaux dans l'hypoderme des tergites ou des sternites d'*Ephippiger*, ou dans l'ensemble des cellules hypodermiques de *Gryllus* (Pl. II, fig. *a*). L'observation devient possible dans les cas où les pigments n'emplissent pas totalement les cellules (*Locusta*) (Pl. II, fig. *c*). Chez certains Tettigonides (*Tettigonia*, *Pholidoptera*) les cellules accumulent les pigments à leur base, les microcristaux à leur apex.

La cuticule ne contient ni cristaux ni granules de pigments.

4. Tube digestif

La comparaison ne portera que sur les trois espèces, *Locusta* M., *Schistocerca* G. et *Gryllus* B.

Le mésentéron ne contient ni cristaux ni pigments. Le gésier présente un épithélium pigmenté chez les Acridiens, mais non chez les Gryllides. Les valvules, stomodéale et proctodéale, ne sont bien développées et pigmentées que chez les Acridiens. Le proctodeum comprend trois segments principaux * : l'iléon ne renferme ni cristaux ni pigments dans sa paroi ; celui des Gryllides modifié en panse à bactéries (Martoja, 1966) ne sera pas envisagé ; le côlon qui lui fait suite est pigmenté chez les Acridiens ; le rectum comprend surtout les papilles rectales dépourvues de cristaux et de pigments. La lumière du proctodeum renferme d'importants dépôts cristallins, situés entre la membrane péritrophique et l'épithélium (Pl. IV, fig. c et d). Nous les avons observés tout le long du proctodeum des Acridiens. Ils sont constitués d'agrégats d'aiguilles biréfringentes et de masses amorphes. Le rectum des Gryllides contient à la fois de tels agrégats cristallins et les sphérocristaux provenant des tubes de Malpighi.

5. Chorion des œufs

Alors que chez certains Insectes, et, en particulier, les Phasmides (Moscona, 1950), des sels minéraux cristallisés constituent une fraction importante du chorion, aucun dépôt cristallin n'existe dans celui des Orthoptères. Le chorion sera envisagé ici dans son ensemble, sans qu'il soit tenu compte des couches qui le constituent (Furieux et coll., 1969) ; seuls *Gryllus* et *Locusta* ont été étudiés à la fois par les méthodes physique et chimiques.

B. Analyse ionique par spectrographie de rayons X

L'analyse a été effectuée d'une part sur des coupes n'ayant subi aucun traitement spécial, d'autre part sur des coupes soumises à des agents « décalcifiants » ou au solvant des urates. Les résultats des analyses sont résumés dans les tableaux des Figures 1 à 7 et sur les Figures 8 à 13.

1. Composition ionique

1. Corps gras

Les sphérocristaux contiennent, dans toutes les espèces, les ions Ca, Mg, K et P en grande quantité ; chez *Gryllus*, il existe, en outre, un peu de sodium et de chlore.

* Nous n'adoptons pas la terminologie contestable de R. Aubry (*Bull. Soc. Zool. Fr.*, 1969, 94, 3, 415-420).

2. Tubes de Malpighi

Les dépôts diffèrent d'une espèce à l'autre à la fois par la nature et par la quantité des ions qu'ils contiennent. Chez *Gryllus*, les sphérocristaux, qu'ils soient intracytoplasmiques ou libres dans la lumière du tube, sont très riches en Ca, Mg, K et P, mais le potassium est moins abondant que dans le corps gras. Chez les Acridiens, le potassium manque ; dans ce groupe, des champs cellulaires riches en ions Ca, Mg et P côtoient des régions plus pauvres. Chez *Locusta*, il semble exister une relation entre la richesse en granules pigmentaires et la teneur en ions. Par suite de l'hétérogénéité du groupe des Tettigonides, et de la variabilité des aspects cytologiques observés chez *Ephippiger*, l'appareil excréteur de ce groupe n'a été que partiellement exploré (Figure 6). Quant aux mucocytes de *Locusta*, seuls analysés, ils ne contiennent que du calcium.

3. Tégument

Les ions Ca, Mg, K et P existent en grande quantité dans les cellules hypodermiques mais leur distribution n'est pas quelconque. Chez *Ephippiger*, les cellules non pigmentées à microcristaux biréfringents accumulent l'ion K seul ; les cellules pigmentées contiennent les ions Ca, Mg et P. Dans les autres espèces et notamment *Locusta*, où la plupart des cellules sont pigmentées, les ions Ca, Mg, P coexistent avec l'ion K dont l'abondance est inversement proportionnelle à la teneur en granules pigmentaires. La cuticule est dépourvue d'ions décelables dans nos conditions techniques.

4. Tube digestif

L'épithélium du mésentéron contient du calcium et du phosphore en quantité moindre que les organes précédents.

Chez les Acridiens, la teneur en ions des segments pigmentés, gésier et côlon, diffère beaucoup selon que ces segments appartiennent au stomodeum ou au proctodeum : les ions Ca et P sont abondants dans le gésier ; le magnésium et le potassium n'existent que dans ce segment. La valvule proctodéale également pigmentée, est très pauvre en potassium, mais riche en ions Ca, Mg et P.

Quant à l'iléon, dépourvu de cristaux et de pigments, il contient du calcium, du magnésium et du phosphore, mais pas de potassium. Enfin, les papilles rectales n'accumulent que très localement une faible quantité d'ions Ca.

Les dépôts contenus dans la lumière proctodéale ont été analysés chez *Schistocerca*, au niveau de l'iléon. Ils contiennent des quantités d'ions Ca, Mg, K et P, et sont dépourvus de sodium et de chlore.

5. Chorion des œufs

Chez *Locusta*, le chorion contient du calcium et du phosphore ; à ces

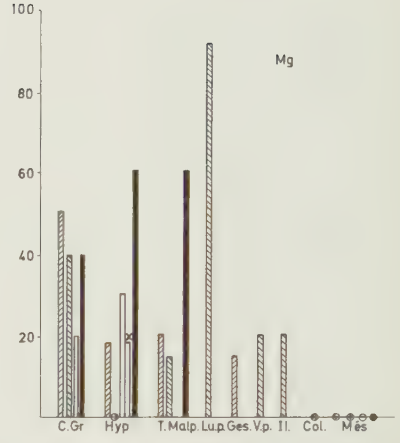
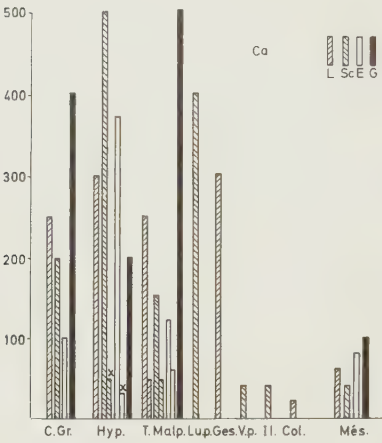


FIGURE 1. Teneur en calcium des principaux organes. Les nombres portés en ordonnées correspondent à l'intensité des raies $K\alpha_1$, exprimée en nombre de chocs/seconde. Les valeurs nulles sont figurées par un cercle. Lorsque l'intensité mesurée diffère selon les régions d'un même organe, deux valeurs sont portées sur le graphique ; pour l'hypoderme, les valeurs signalées par une croix correspondent aux régions les moins pigmentées. L, *Locusta* ; Sc, *Schistocerca* ; E, *Ephippiger* ; G, *Gryllus* ; C Gr, corps gras ; Hyp, hypoderme ; T Malp, tubes de Malpighi ; Lu p, lumière proctodéale ; Ges, gésier ; V p, valvule proctodéale ; Il, iléon ; Col, côlon ; Més, mésentéron.

FIGURE 2. Teneur en magnésium des principaux organes. Même légende et mêmes remarques que pour la Figure 1.

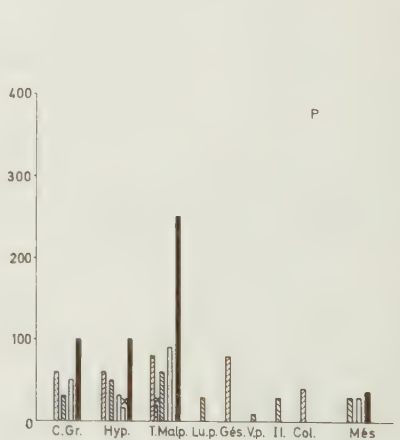
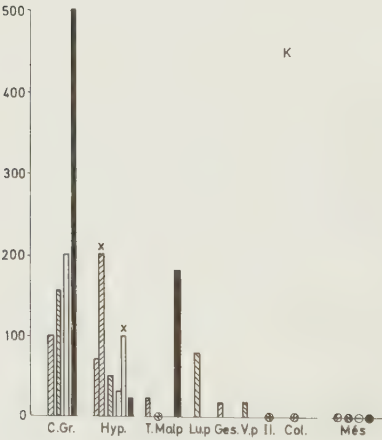


FIGURE 3. Teneur en potassium des principaux organes. Même légende et mêmes remarques que pour la Figure 1.

FIGURE 4. Teneur en phosphore des principaux organes. Même légende et mêmes remarques que pour la Figure 1.

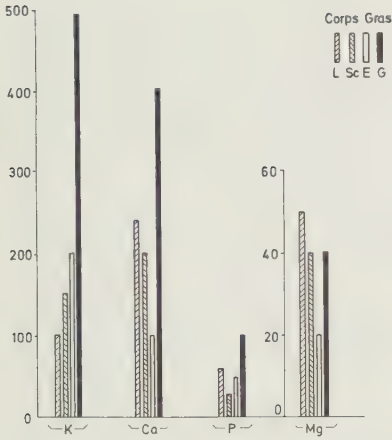


FIGURE 5. Teneur en ions K, Ca, P et Mg du corps gras des diverses espèces. Même légende et mêmes remarques pour la Figure 1.

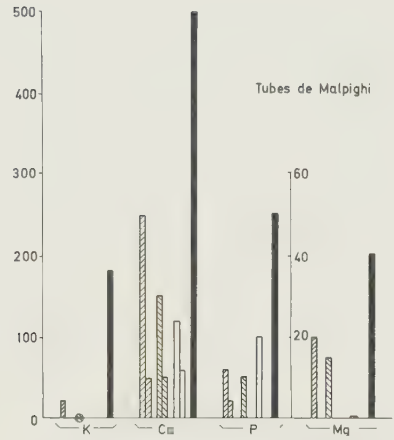


FIGURE 6. Teneur en ions K, Ca, P et Mg des tubes de Malpighi des diverses espèces. Même légende et mêmes remarques que pour la Figure 1.

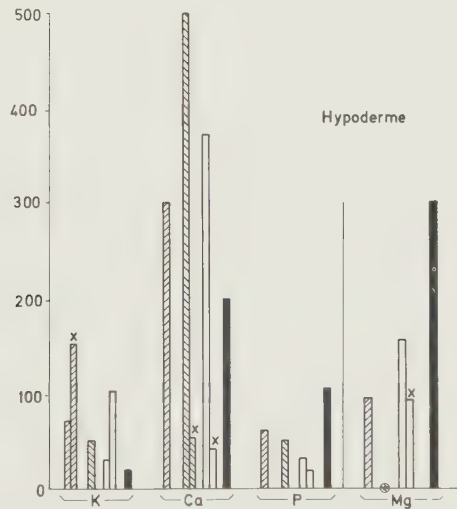


FIGURE 7. Teneur en ions K, Ca, P et Mg de l'hypoderme de diverses espèces. Même légende et mêmes remarques que pour la Figure 1.

ions s'ajoutent, chez *Gryllus*, le magnésium et le potassium (Figure 8).

L'analyse spectrographique met donc en évidence, dans tous les tissus examinés, des ions P, Ca, Mg ou K, conservés par la fixation histologique ; mais le chlore et le sodium ne sont accumulés, en très faibles quantités, que dans le corps gras des Gryllides. Sur le plan *quantitatif*, on doit noter la grande abondance du calcium et du magnésium, non seulement dans les organes excréteurs classiques (tubes de Malpighi,

corps gras), mais dans d'autres organes : la teneur en calcium du gésier ou de l'hypoderme des Acridiens atteint ou dépasse celle des tubes de Malpighi ; le mésentéron des Acridiens et des Tettigonides est également riche en calcium. Il apparaît un parallélisme net entre la teneur en ion P et celle en ions Ca et Mg de certains organes (corps gras, tubes de Malpighi, hypoderme). Il n'en est pas de même pour les ions P et K qui, dans certains organes au moins, paraissent s'exclure (hypoderme des Tettigonides). La quantité d'ions K semble dépendre à la fois de l'organe et de l'espèce envisagés.

II. Effets des agents « décalcifiants » et d'un solvant des urates sur la teneur en ions (Figures 9 à 13)

L'analyse comparative des dépôts ioniques sur coupes normales et sur coupes témoins n'a été réalisée que dans les cas où les agents utilisés pour la réalisation des témoins ne provoquent pas une destruction complète des structures cristallines.

La « décalcification » par l'alcool-nitrique conserve les cristaux. Elle élimine 90 à 100 % des ions Ca de la plupart des dépôts ioniques des

FIGURE 8. Enregistrements des raies caractéristiques des ions Ca, Mg et K du chorion de l'œuf de *Gryllus*. Compte tenu du fait que les enregistrements ont été réalisés avec des sensibilités et des cristaux analyseurs différents, les hauteurs des trois pics ne peuvent être comparées.

FIGURE 9. Enregistrement des raies $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$ du calcium, dans la paroi de l'iléon de *Locusta*. A droite, coupe normale ; à gauche (flèche) coupe déminéralisée par l'eau nitrique. Remarquer la disparition totale des ions Ca.

FIGURE 10. Enregistrement des raies $K\alpha_1$ du phosphore dans la paroi de l'iléon de *Locusta*. A droite, coupe normale ; à gauche, coupe déminéralisée par l'eau nitrique. Noter la persistance de la totalité des ions P (même sensibilité de l'appareil pour les deux enregistrements). Comparer avec la Figure 9.

FIGURE 11. Enregistrement des raies $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$ du calcium des tubes de Malpighi de *Locusta*. A droite, coupe normale ; à gauche (flèche), coupe déminéralisée par l'eau nitrique.

FIGURE 12. Enregistrement des raies $K\alpha_1$ du phosphore dans les tubes Malpighi de *Locusta*. A droite, coupe normale ; à gauche, coupe déminéralisée par l'eau nitrique. Noter la persistance d'une fraction des ions P. La sensibilité choisie pour l'enregistrement de gauche est trois fois plus grande que pour celui de droite. Comparer avec la Figure 11.

FIGURE 13. Enregistrement des raies $K\alpha_1$ du potassium des tubes de Malpighi de *Gryllus*. A droite, coupe normale ; au centre, coupe déminéralisée par l'alcool nitrique ; à gauche, coupe traitée par la pipérazine. Noter la persistance d'ions K dans les deux coupes traitées. La sensibilité choisie pour les enregistrements des deux coupes traitées est dix fois plus grande que pour la coupe normale.

cellules non pigmentées (Figure 9) ; l'extraction est parfois moins importante au niveau des cellules pigmentées. Le magnésium est complètement éliminé. Le phosphore disparaît presque complètement des tubes de Malpighi des Gryllides ; dans d'autres organes, au contraire, il est conservé en grande partie (tubes de Malpighi de *Locusta*, Figure 12) voire totalement (iléon des Acridiens, Figure 10). Quant au potassium, il est intégralement conservé sauf dans les tubes de Malpighi des Gryllides, où 80 % des ions K sont extraits (Figure 13). L'eau nitrique n'est pas utilisable au niveau du corps gras, où elle détruit les cristaux. Dans les tissus dépourvus de potassium, elle donne sensiblement les mêmes résultats que l'alcool nitrique (Figure 12) ; dans les tubes de Malpighi des Gryllides, elle élimine la totalité des ions P, Ca, Mg et K.

La pipérazine détruit les cristaux du corps gras. Ailleurs, elle est sans effet sur les teneurs en ions Ca, Mg et P. L'ion K, par contre, est extrait complètement des régions à microcristaux de l'hypoderme, en partie seulement des tubes de Malpighi de *Gryllus* (Figure 13).

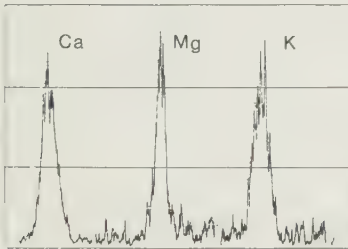


FIGURE 8

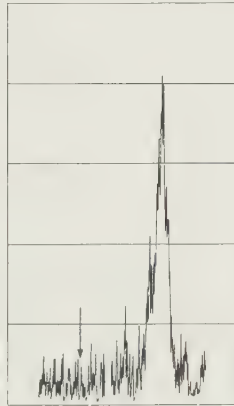


FIGURE 9

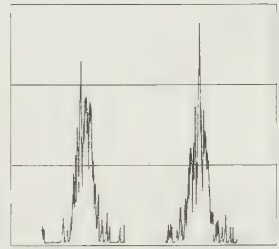


FIGURE 10

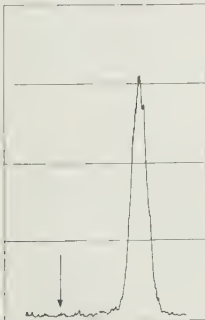


FIGURE 11

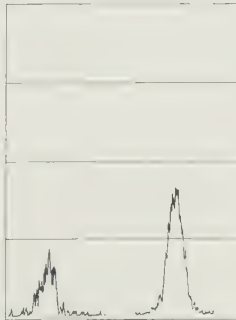


FIGURE 12

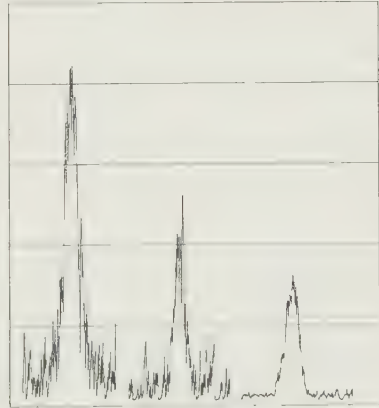


FIGURE 13

En résumé, les solutions nitriques représentent des agents déminéralisants éliminant aussi bien l'ion Mg que l'ion Ca. Elles laissent toutefois en place une fraction plus ou moins importante des ions P ; de ce fait, dans la mesure où cet atome correspond à du phosphore minéral, on doit s'attendre à observer certaines anomalies lors de l'application, à des coupes « décalcifiées », de certaines méthodes cytochimiques révélant les anions. Dans la plupart des organes, le potassium est éliminé non par les agents déminéralisants, mais par le solvant des urates. Les tubes de Malpighi des Gryllides font exception car une partie du potassium disparaît par action de l'alcool nitrique et l'autre partie par action du solvant des urates. L'eau nitrique, agent déminéralisant qui est, de plus, incompatible avec la préservation des urates, élimine l'ensemble des ions.

C. Recherche microchimique des carbonates

La recherche des carbonates s'est révélée négative dans tous les organes examinés, aussi bien à l'état frais qu'après fixation.

D. Résultats des méthodes cytochimiques appliquées aux organes

1. Corps gras

L'étude de cet organe pose des problèmes techniques inattendus et souvent difficiles. En effet, bien que s'appliquant à des sphérocristaux qui, dans toutes les espèces, sont de composition ionique identique, la plupart des techniques cytochimiques donnent des résultats très différents selon la position systématique de l'insecte. Ces résultats discordants peuvent *en partie* s'expliquer par des phénomènes de dissolution qui sont très importants chez les Ensifères : dans ce groupe, les solutions aqueuses neutres ou acides entraînent une disparition rapide des sphérocristaux, alors qu'elles sont sans effet chez les Acridiens. De ce fait, la simple hydratation des coupes de corps gras d'Ensifères et, *a fortiori*, une immersion dans un réactif à bas pH, entraînent une impossibilité presque complète d'application des techniques cytochimiques.

Quelle que soit l'espèce, la mise en évidence de l'acide urique est possible en milieu alcalin (méthode de Gomori) (Pl. I, fig. c) ; mais à bas pH (méthode de Schmorl, pH 2,5), seuls les cristaux des Acridiens réagissent (Pl. I, fig. f), l'acidité du réactif dissolvant le plus souvent les cristaux des Ensifères.

La recherche du potassium ne donne de résultats positifs que chez les Ensifères, et seul un très petit nombre de cristaux sont conservés et réagissent.

Le magnésium n'est lui aussi révélé que très partiellement par le jaune titan, et chez les seuls Ensifères ; la laque se forme au niveau de fines strates concentriques, séparées les unes des autres par de larges

zones non colorables. L'alizarine donne également une laque au niveau des strates minces, et chez les Ensifères seulement ; la plupart des cristaux disparaissent d'ailleurs dans le réactif.

Les deux techniques utilisées pour la mise en évidence des phosphates ne présentent pas le même intérêt. La substitution à l'argent peut être pratiquée sans précautions spéciales chez les Acridiens, où elle donne des résultats valables et reproductibles : chez les Ensifères, elle doit être appliquée à des coupes non hydratées ; les localisations positives correspondent alors aux strates riches en ions Mg et Ca (Pl. I, fig. a, b, d, e). La substitution au cobalt (pH 6,5) convient au corps gras de *Locusta*, mais non à celui de *Schistocerca* ; elle n'est possible chez les Ensifères que si le pH de la solution de substitution est élevé par addition de véronal sodique. Des deux techniques, celle à l'argent est d'une application plus facile, et donne des résultats très reproductibles ; contrairement à ce que laisse prévoir le test effectué *in vitro*, les urates ne semblent pas réagir positivement : l'observation des volumineux cristaux des Ensifères montre l'absence de réactivité des strates larges et la concordance de localisation des phosphates et des ions Ca et Mg. Cette absence de réactivité des urates est intéressante, dans la mesure où elle rend inutile la réalisation de préparations-témoins débarrassées des urates : leur extraction élective est en effet impossible, le solvant utilisé détruisant complètement les sphérocristaux et entraînant, de ce fait, les sels minéraux. L'extraction élective des phosphates, possible en milieu *alcoolique* qui seul maintient les cristaux, n'est pas plus valable, puisqu'elle conserve une fraction des ions PO_4 ; la persistance d'une réactivité à la méthode de Von Kossa confirme cette donnée de l'analyse spectrographique.

	<i>Locusta</i>	<i>Schistocerca</i>	<i>Gryllus</i>	<i>Ephippiger</i>
Analyse à la microsonde (Na et Cl exceptés)	Ca, Mg, K, P			
Gomori	+++	+++	+++	+++
Schmorl	+++	+++	—	—
Cobalthexanitrite	—	—	+(p)	?
Jaune titan	—	—	+(p)	+(p)
Alizarine	—	—	+(p)	+(p)
Von Kossa	+++	+++	+(m)	+(m)
Stoelzner	+	—	+(m)	+(m)

(p) révélation très partielle.

(m) après modification de la technique.

En résumé, seuls l'acide urique et les phosphates peuvent être révélés cytochimiquement dans l'ensemble des Orthoptères. Pour l'acide urique, la réaction argentaffine est la seule méthode applicable à toutes les espèces. Pour les phosphates, seule la substitution à l'argent est d'un emploi général, sous réserve que l'hydratation soit évitée dans le cas des Ensifères.

2. Tubes de Malpighi

Contrairement à ceux du corps gras, les sphérocristaux des tubes de Malpighi résistent aux traitements par les solutions acides. Mais la présence de pigments figurés crée une difficulté dans l'interprétation des réactions cytochimiques conduisant à un composé terminal noir.

Chez *Gryllus*, l'acide urique n'est décelable à bas pH (méthode de Schmorl) qu'au niveau des cristaux libres dans la lumière du segment proximal, à l'exclusion des cristaux intracytoplasmiques. Après élimination des phosphates, la méthode de Gomori révèle de l'acide urique également dans les cristaux intracytoplasmiques (Pl. II, fig. f). Les tubes de *Schistocerca* sont dépourvus d'acide urique, ceux de *Locusta* ne semblent pas en contenir, si l'on en juge par l'absence de noircissement des grains de pigments.

Le potassium n'est révélaible que chez *Gryllus*, et seulement dans les cristaux de la lumière (Pl. III, fig. c).

Le magnésium est localisable dans les sphérocristaux des Gryllides (Pl. III, fig. b) et des Tettigonides. Chez *Schistocerca*, le jaune titan fait apparaître de petits grains positifs : les granules pigmentaires de *Locusta* se trouvent décolorés par le réactif et réagissent alors intensément (Pl. IV, fig. a). Dans tous les cas, seules les fortes teneurs en ions Mg sont révélaibles.

L'alizarine donne une laque au niveau des accumulations des ions Ca et Mg ; les images obtenues sont souvent diffuses et sans relation avec les fines structures cellulaires (Pl. III, fig. a, f).

Les phosphates sont décelables sans ambiguïté possible dans les sphérocristaux des Gryllides (Pl. II, fig. d), et chez *Schistocerca* sous forme de petits grains (Pl. IV, fig. b). Les résultats de la méthode de Von Kossa sont difficiles à interpréter dans le cas de *Locusta* (Pl. III, fig. d, e) où la réaction produit un noircissement des granules pigmentaires ; les tubes non pigmentés ne réagissent pas. Dans cette espèce, la « décalcification » n'abolit pas la réactivité des grains de pigments, mais on sait que la déminéralisation de ces structures est incomplète. Chez les Gryllides, la réalisation de préparations-témoins est possible soit par élimination des phosphates, soit par extraction des urates. L'élimination des phosphates abolit la réactivité des cristaux à l'alizarine ou au jaune titan. Quant à la méthode de substitution au cobalt (Stoelzner), elle ne révèle qu'une partie des cris-

taux : la comparaison des images obtenues chez *Gryllus* est, à cet égard, très suggestive (Pl. II, fig. *d*, *e*). Elle est pourtant la seule qui permette d'éliminer l'obstacle créé par les pigments des Acridiens : le traitement final par le sulfure d'ammonium, dont il convient d'allonger la durée (10 mn), décolore complètement les pigments. La comparaison des résultats de cette méthode et de la technique au jaune titan permet de démontrer l'identité de localisation des ions PO_4 et Mg, qui se trouvent situés dans les grains de pigments.

Quant aux mucocytes, ils réagissent négativement à toutes les techniques cytochimiques utilisées.

	Cellules excrétrices				Muco- cytes <i>Locusta</i>
	<i>Locusta</i>	<i>Schisto- cerca</i>	<i>Gryllus</i>	<i>Ephip- piger</i>	
Analyse à la microsonde	Ca, Mg, P	Ca, Mg, P	Ca, Mg, K P	Ca, Mg, K ?, P	Ca
Pigments	+	—	—	—	—
Gomori	— ?	—	+	±	—
Schmorl	—	—	+ (p)	?	—
Cobalthexanitrite	—	—	+ (p)	—	—
Jaune titan	+	+	+	+	—
Alizarine	+	+	+	+	—
Von Kossa	+ ?	+	+++	+	—
Stoelzner	+	—	+	+	—

(p) révélation partielle.

En résumé, comme dans le cas du corps gras, la méthode de Gomori est applicable ; de plus, ses résultats peuvent être contrôlés par élimination des urates. Pour les autres techniques, les difficultés d'application proviennent soit d'un manque de sensibilité (alizarine, jaune titan), soit de la présence de structures pigmentées d'ailleurs difficiles à déminéraliser, soit de causes indéterminées (Stoelzner).

3. Tégument

Plus encore que dans les tubes de Malpighi de *Locusta*, l'étude cytochimique de l'hypoderme est rendue difficile, voire impossible, par l'accumulation considérable d'ommochromes souvent très noirs (Pl. II, fig. *a*). Seul l'hypoderme latéral de l'abdomen d'*Ephippiger* (Pl. I, fig. *g*) échappe totalement à cette difficulté. Ici, malgré la richesse en potassium, la réac-

tion au cobalthexanitrite reste négative ; par contre, la présence d'acide urique est aisée à démontrer par la technique de Schmorl (Pl. I, fig. i) accompagnée d'un test d'extraction à la pipérazine. Mais la réduction du complexe d'argentométhénamine est lente. Aucune méthode de substitution ne révèle de phosphates dans les microscristaux.

Au niveau des grains de pigments, les méthodes de substitution décèlent, dans les cas les plus favorables (*Ephippiger*), des phosphates sous forme de strates concentriques. Toutes les autres réactions donnent des résultats négatifs ou masqués par la couleur naturelle des grains.

La cuticule se colore intensément par le jaune titan.

4. Tube digestif

L'acide urique n'est décelable à aucun niveau de l'épithélium intestinal. Les granules de pigments du gésier ou du côlon ne réagissent pas aux techniques de mise en évidence des divers ions. Mais l'iléon des Acridiens est remarquable par le fait qu'il existe un très grand nombre de granules Von Kossa-positifs, situés dans la région supranucléaire des cellules (Pl. IV, fig. e) ; la réactivité des granules est conservée après action des agents « décalcifiants ». De même, la déminéralisation des très nombreux granules Von Kossa-positifs du mésentéron est incomplète. Dans ces deux cas (iléon, mésentéron), la détection cytochimique des cations reste infructueuse. La valvule proctodéale de *Schistocerca*, relativement peu pigmentée, montre une accumulation de granules identiques aux précédents, indépendants des grains d'ommochromes et plus petits qu'eux.

Les dépôts ioniques situés dans la lumière du proctodeum des Acridiens (Pl. IV, fig. c, d) sont riches en acide urique. Le calcium et les phosphates sont décelables par l'alizarine et la méthode de substitution à l'argent ; la localisation de ces ions ne coïncide pas avec celle de l'acide urique.

5. Chorion des œufs

Le chorion réagit positivement aux méthodes de Von Kossa et de Stoelzner (Pl. IV, fig. f) ; il se colore intensément par l'alizarine.

DISCUSSION

I. L'application des techniques cytochimiques à des accumulations ioniques dont la composition a été préalablement déterminée par spectrographie, permet de reconsidérer le problème de la valeur de ces techniques.

Dans le cas de la méthode argentaffine de Gomori, la seule cause d'erreur mentionnée par l'auteur de la méthode, concerne la présence de quantités importantes de sels de calcium, situation qui est réalisée dans

les organes étudiées ici. Les tests que nous avons réalisés *in vitro* ou sur des phosphates artificiellement formés, montrent qu'en fait la réduction du complexe d'argentométhénamine est sans doute trop lente pour produire un dépôt appréciable d'argent dans les conditions où la technique est appliquée aux coupes. Et, en réalité, nous n'avons pas observé d'interférences sur nos préparations histologiques : certains des organes étudiés, dépourvus d'urates, contiennent des quantités importantes de phosphates, qui ne réduisent jamais le complexe argentique. Cette absence de réactivité des phosphates des organes d'Orthoptères est intéressante dans la mesure où la réalisation de préparations-témoins par élimination des sels minéraux (test d'extraction de Gomori à l'alcool nitrique) s'avère impossible, l'analyse spectrographique démontrant la persistance des ions phosphates. La méthode argentaffine de Gomori paraît donc très valable pour la détection des urates des Orthoptères. Par contre, la *technique de Schmorl* au ferricyanure ferrique, elle aussi très séduisante *a priori* puisqu'elle ne révèle pas les phosphates, est d'une application plus limitée, par suite du très bas pH qu'elle impose et qui est incompatible avec la conservation de nombreux cristaux ; mais, pour certains organes (hypoderme), elle donne des résultats supérieurs à ceux de la méthode de Gomori ; cette supériorité est due à une réduction beaucoup plus rapide du ferricyanure ferrique, comme nous avons pu le vérifier *in vitro*.

On sait que les *méthodes de substitution*, appliquées couramment à la détection du calcium révèlent non le cation, mais l'anion. L'intérêt de ces méthodes dans la mise en évidence des sels calciques est plus morphologique que chimique, bien que certains auteurs admettent que le calcium représente le cation prépondérant des dépôts minéraux. Or, la remarque de Gomori (1952) concernant l'absence de spécificité de la méthode de Von Kossa appliquée aux Végétaux, est transposable aux Insectes, chez lesquels l'analyse par spectrographie révèle l'abondance d'autres cations (Mg, K) associés au calcium. La concordance entre les images de localisation des phosphates (Von Kossa) et des ions Ca et Mg, ainsi que le parallélisme entre les teneurs en P d'une part, Ca et Mg d'autre part (analyse spectrographique), conduisent à penser qu'effectivement des phosphates de magnésium sont le plus souvent associés aux phosphates de calcium. L'argent ou le cobalt doivent donc se substituer aussi bien au magnésium qu'au calcium. L'utilisation d'agents « décalcifiants », qui transforment les phosphates en sels plus solubles, ne permet pas la distinction entre les deux cations, le nitrate de magnésium étant plus soluble que le phosphate correspondant ; nous avons d'ailleurs constaté, par spectrographie, une effective disparition des ions Mg après « décalcification ». Nous considérons donc, qu'à défaut d'une analyse atomique, l'identification du cation requiert l'utilisation d'autres techniques cytochimiques que celles de substitution. Malgré ces réserves, il

est certain que les méthodes de substitution garderont la faveur des cytochimistes, par la précision qu'elles apportent dans la localisation des sels minéraux.

Des deux techniques que nous avons utilisées (substitution à l'argent ou au cobalt), la première nous paraît la meilleure. Il est admis, ainsi que nous avons d'ailleurs pu le constater *in vitro*, que l'acide urique réagit positivement à la méthode de Von Kossa (Gabe, 1969). L'interprétation des résultats exige donc, en principe, la réalisation de préparations-témoins. Celles-ci s'avèrent très difficiles à obtenir, pour des raisons qui dépendent à la fois du test utilisé et de l'organe envisagé. Ainsi, l'élimination élective de l'acide urique peut, soit conserver les cristaux (tubes de Malpighi des Gryllides), soit au contraire les détruire (corps gras), rendant toute recherche cytochimique ultérieure impossible. Cette différence de « résistance » des cristaux dépend sans doute de leur teneur relative en urates : ainsi que nous le verrons, les phosphates prédominent dans les cristaux des tubes de Malpighi, alors que ce sont les urates qui constituent la plus grande partie de ceux du corps gras ; dans ce dernier cas, l'élimination du constituant essentiel fait disparaître l'édifice cristallin dans sa totalité. Quant à la déminéralisation, en principe réalisable en milieu alcoolique où les urates sont conservés, rappelons qu'elle conserve une partie des ions phosphates et doit donc être évitée. Malgré ces inconvénients, les résultats de la méthode de Von Kossa, restent interprétables dans les cas où les urates et les sels minéraux sont localisés dans des cellules différentes (hypoderme d'*Ephippiger*). Ils le sont également quand l'extraction élective des urates est possible (tubes de Malpighi des Gryllides). De plus, on est en droit de douter d'une réactivité des urates, dans la mesure où les microcristaux d'urates de l'hypoderme ne donnent jamais de réaction positive et où des strates des sphérocristaux du corps gras ne réagissent pas. La substitution à l'argent nous paraît donc une méthode très valable pour la caractérisation des phosphates.

La technique au cobalt, par contre, ne nous semble intéressante que dans la mesure où le traitement terminal élimine les pigments ; dans les autres cas, elle conduit, contrairement à ce qui est connu chez les Vertébrés (Gabe, 1969), à des artéfacts par images faussement négatives.

Parmi les *méthodes aux laques*, la technique à l'alizarine à pH 4,5 est d'un usage courant pour la détection du calcium, bien que des interférences possibles avec de nombreux ions, dont le magnésium, aient été signalées (Pearse, 1961 ; Gurr, 1958). Les tests que nous avons pratiqués montrent qu'une laque rouge est donnée par les ions Ca, Mg et, avec une plus faible intensité, par les ions K. Il est assez surprenant de constater l'absence de réactivité des importants dépôts d'urates de potassium ; peut-être y aurait-il lieu d'envisager la nature moléculaire des composés renfermant l'ion K. D'autre part, l'absence de réactivité des sphérocrist-

taux du corps gras des seuls Acridiens demeure inexplicable, les cristaux des Acridiens ne semblant différer de ceux des Ensifères que par la taille.

Quoi qu'il en soit, les résultats positifs obtenus sur les cristaux riches en phosphates de Ca et Mg peuvent être rapportés à l'existence de ces deux cations. L'alizarine employée seule ou associée à des traitements « décalcifiants » qui, en fait, éliminent l'ensemble des ions Mg et Ca, n'est pas une méthode élective de mise en évidence du calcium. Il convient de l'associer soit à une analyse par spectrographie, soit à une technique cytochimique élective de l'ion Mg. La détection de ce dernier par le *jaune titan* est, selon certains auteurs (Gomori, 1952) inapplicable aux tissus animaux. Nous pensons, au contraire, que les résultats négatifs proviennent uniquement des conditions d'application de la technique. Il suffit, selon nous, de supprimer la déshydratation des préparations traitées par le jaune titan, déshydratation préconisée dans la plupart des ouvrages de techniques. La laque formée n'étant stable qu'à pH fortement alcalin, la préparation doit être, après lavage, examinée dans la soude 2 N. Dans ces conditions, des résultats positifs et parfaitement reproductibles sont obtenus au niveau des structures riches en magnésium. La méthode au jaune titan nous paraît donc très intéressante malgré les rares artéfacts par images faussement positives (cuticules) ou faussement négatives (corps gras des Acridiens) qu'elle peut donner. Elle présente, en outre, l'avantage de décolorer les pigments.

Dans la recherche élective du potassium, la *méthode au cobalthexanitrite* satisfaisante sur le plan théorique, mais jusqu'ici utilisée pour révéler le potassium diffusible, est rarement applicable au cation stable. L'analyse à la microsonde nous semble donc la seule technique valable pour l'identification des sels de potassium.

En résumé, la caractérisation cytochimique de l'acide urique, des ions Ca, Mg, K et PO_4 ne peut être abordée qu'après le choix rigoureux de techniques convenant à la fois à l'organe et à l'espèce étudiés. Rares sont les méthodes applicables à tous les cas. La signification des techniques d'élimination élective des phosphates ou des urates dépend également de l'organe et de l'espèce. L'élimination « accidentelle » des phosphates par un solvant des urates comme la pipérazine, résulte d'une destruction trop importante du cristal ; l'élimination des phosphates par des solutions d'acide nitrique est incomplète, voire impossible dans certains cas, tel l'iléon. La simple transposition d'une méthode réputée classique d'une espèce à une autre, pourrait conduire, lors de l'étude d'organes homologues, à des conclusions erronées : rappelons que les sphérocristaux du corps gras des Acridiens conviennent, du fait de leur faible solubilité, à l'application de la méthode de Von Kossa, alors qu'il n'en est pas de même pour ceux du corps gras des Ensifères. Cette différence de résistance de cristaux de composition ionique identique reste, dans l'état

actuel de nos recherches, inexplicable ; peut-être faut-il mettre en cause des facteurs physiques, ou chimiques (teneur différente en polyanions de la matrice organique, présence possible, chez les seuls Célibères, d'acide urique pur, beaucoup moins soluble que les urates).

Indépendamment du problème de spécificité des méthodes, la caractérisation cytochimique des constituants d'un dépôt ionique nécessite donc :

- la conservation des ions par le fixateur. Le mélange de Carnoy est conseillé, car il ne provoque de dissolution ni des urates ni des sels minéraux (Ballan-Dufrançais, inédit) ;
- la conservation de l'intégrité des dépôts ioniques lors des traitements précédant l'application des techniques cytochimiques ;
- le choix de méthodes cytochimiques qui laissent en place les ions à caractériser, et de tests de contrôle qui éliminent totalement l'ion considéré sans entraîner l'extraction accidentelle d'autres ions.

Il reste néanmoins des cas qui ne peuvent être résolus par la seule caractérisation cytochimique : ainsi, la présence de l'ion le plus fréquemment recherché, le calcium, ne peut en aucune manière être déduite des seules données des méthodes cytochimiques usuelles.

Méthodes cytologiques et analyse par spectrographie permettent donc à la fois d'établir avec certitude la composition des dépôts ioniques et de localiser les ions au niveau des structures cytologiques. Elles permettent également d'envisager la *composition moléculaire probable* de ces dépôts, avec d'autant plus de certitude que la composition des cristaux est moins complexe ou que des extractions électives sont possibles. Ainsi, il paraît certain que les microcristaux hypodermiques sont constitués d'urate de potassium ; la concordance des images de localisation des ions PO_4 , Ca et Mg du corps gras, l'absence d'acide urique et de potassium dans certains épithéliums riches en P, Ca et Mg (iléon, mésentéron), le parallélisme entre les teneurs en ions Ca, Mg et P, conduisent à envisager l'existence de phosphates de calcium et de magnésium. Les sphérocristaux contenant de l'acide urique et des phosphates seraient constitués de strates d'urate de potassium et de strates de phosphate de calcium et de magnésium (corps gras, tubes de Malpighi) ; on notera, à cet égard, que l'accroissement de la teneur en ions K qu'on observe en comparant le corps gras des Acridiens et des Gryllides ne s'accompagne pas d'une augmentation corrélative de la teneur en ion P, ce qui rend peu probable l'existence de quantités importantes de phosphate de potassium dans cet organe.

II. Certains résultats apportent un complément à nos connaissances sur la physiologie des Insectes, et plus particulièrement des Orthoptères (Figures 14 et 15).

Les dépôts ioniques des Orthoptères ont une composition variable et qui atteint une grande complexité dans le cas des volumineuses inclusions cristallines du type « sphérocrystal ». Pour ces cristaux, compte tenu du mélange constant de phosphates et d'urates, les termes d'urosphérîtes ou de calcosphérîtes nous paraissent devoir être abandonnés.

Les cations révélés ne semblent jamais intégrés dans des complexes organiques comme le serait le calcium de l'oothèque des Blattes, selon l'hypothèse de Hackman et Goldberg (1960). Il est certes des cas, rares toutefois, où la déminéralisation conserve des ions calcium, mais les anions sont également conservés et, d'une façon générale, les déminéralisations difficiles concernent davantage les anions (Figures 10 et 12).

Il est bien connu que l'essentiel des déchets azotés s'accumulent dans le *corps gras* sous forme d'urosphérîtes. Parfois, chez les Diptères par exemple, ils sont plus spécialement associés au calcium et nommés calcosphérîtes (voir Wigglesworth, 1965). Chez les Orthoptères, les cristaux ont une composition complexe (acide urique, Ca, Mg, K, P) ; les phosphates de magnésium et de calcium sont abondants et coexistent avec des urates de potassium et peut-être avec de l'acide urique. Les faibles quantités de sodium et de chlore révélées chez les Gryllides n'ont pu être situées plus précisément dans les cristaux et nous n'avons pu déterminer dans quelles molécules ces atomes étaient engagés.

Les sphérocristaux des *tubes de Malpighi* des Gryllides ont fait l'objet d'une tentative d'analyse cytochimique (Berkaloff, 1961). Ils seraient constitués d'un mélange d'urates de calcium et de phosphates de calcium. Compte tenu des techniques utilisées et de l'interprétation assez originale des résultats, il nous paraît difficile d'admettre sans réserves les conclusions de cet auteur. Nos résultats démontrent que les sphérocristaux des Gryllides contiennent surtout des phosphates de calcium et de magnésium, une quantité moins importante de phosphate de potassium, et une quantité d'urate de potassium assez variable : c'est surtout dans la lumière des tubes que les cristaux s'enrichissent en potassium ce qui leur confère une réactivité au cobalthexanitrite ; corrélativement, un enrichissement en acide urique provoque une réduction du ferricyanure ferrique (Schmorl). Etant donné le nombre limité des cations recherchés, il se peut d'ailleurs que les cristaux des tubes de Malpighi des Gryllides aient une composition encore plus complexe*. Les résultats peuvent néanmoins être comparés aux données de Waterhouse (1950) sur *Lucilia* : dans les deux cas, le calcium et le magnésium existent sous forme de phosphates, mais les carbonates manquent chez *Gryllus* ; par contre l'acide urique et le potassium n'existent pas chez *Lucilia* ; ce dernier

* Des quantités importantes de manganèse ont été décelées par Ballan-Dufrançais et Lhonoré (inédit).

fait nous semble apporter un argument à notre hypothèse d'une liaison chimique entre l'acide urique et le potassium.

Très différente de celle des Gryllides est la composition des dépôts ioniques des Acridiens, dans lesquels les ions K et l'acide urique manquent toujours : seuls existent des phosphates (Ca, Mg) qui, dans certaines espèces sont en relation avec les granules pigmentaires.

Alors que les caractères ultrastructuraux laissent pressentir un fonctionnement identique de l'appareil excréteur dans tous les groupes d'Orthoptères (Berkaloff, 1961), l'analyse ionique conduit, au contraire, à opposer les Gryllides aux Acridiens. Chez les premiers, les phénomènes d'accumulation dans des sphérocristaux prédominent, au moins pour les ions étudiés ici ; chez les seconds, seuls les phosphates de calcium et de magnésium s'accumulent, alors que l'acide urique et le potassium (Ramsay, 1953) transitent sous une forme soluble jusque dans la lumière du proctodéum, où ils précipitent à la suite d'une réabsorption d'eau.

L'aspect morphologique des structures d'accumulation varie également selon les groupes : les méthodes de caractérisation des phosphates et du magnésium montrent que les phosphates minéraux se localisent dans les granules pigmentaires lorsque ceux-ci existent (*Locusta*), mais que le pigment ne représente pas un élément indispensable (*Schistocerca*). Il conviendra de rechercher dans quelle mesure les granules pigmentaires des Acridiens peuvent être assimilés à un simple sphérocrystal minéral accumulant des pigments ; cette hypothèse nous semble valable dans la mesure où les sphérocristaux des Gryllides peuvent exceptionnellement se charger de pigments. Enfin, le dépôt de calcium cytochimiquement indécélable dans les mucocytes pose le problème d'une relation entre ce cation et les seuls polyanions sécrétés.

Dans l'*hypoderme* des Insectes, la cristallisation d'acide urique a été reconnue pour les Lépidoptères et les Hétéroptères. Le dépôt de pigments a parfois été rapporté à un phénomène d'excrétion, chez les Isoptères notamment. Les données obtenues chez les Orthoptères montrent l'importance de l'hypoderme en tant qu'organe d'accumulation de sels minéraux et d'acide urique ; elles mettent aussi en lumière une différence morphologique et cytologique très nette entre les deux types de composés accumulés. L'acide urique cristallise sous forme de microcristaux d'urate de potassium dans les régions cytoplasmiques non pigmentées. Les phosphates de calcium et de magnésium sont en relation, au contraire, avec les granules pigmentaires. Seul l'examen ultrastructural permettra d'identifier les structures qui sont le siège de la cristallisation des urates, alors qu'il est probable, compte tenu des observations faites au niveau des tubes de Malpighi, que les mêmes structures accumulent les pigments et les phosphates. Une concordance analogue entre dépôt de phosphates et pigmentogenèse existe dans certains segments du *tube digestif* des

Acridiens. L'examen comparatif du gésier et du côlon, tous deux riches en pigments, mais différent par la composition ionique, montre toutefois, que la réalisation d'un globule pigmentaire peut s'effectuer en l'absence de dépôt important d'ions Ca, Mg ou P (côlon). Inversement, d'autres segments de l'appareil digestif accumulent des phosphates en l'absence non seulement de granules pigmentaires, mais aussi de toute structure identifiable au microscope photonique (iléon des Acridiens, mésentéron de tous les Orthoptères). Une situation plus complexe est réalisée dans la valvule proctodéale des Acridiens, où, indépendamment des granules pigmentaires vraisemblablement minéralisés, d'autres structures cytologiques encore indéterminées se chargent d'ions. Dans le domaine de la *physiologie de l'appareil digestif*, certains faits originaux se dégagent de cette étude. Ainsi, l'accumulation de quantités importantes de sels minéraux dans le *mésentéron* n'est pas le propre des ordres d'Insectes où les cellules intestinales sont riches en sphérocristaux (Hyménoptères, Homoptères). On sait, par ailleurs, que la paroi du mésentéron est perméable à l'eau et aux ions et il a été suggéré un rôle de ce segment dans l'homéostasie (Sauer et Mills, 1969). La précipitation de phosphates dans la paroi des cellules absorbant les produits de la digestion, pourrait représenter l'un des moyens dont dispose la région absorbante du tube digestif pour assurer une régulation de la quantité d'ions qui doivent franchir la barrière intestinale.

Le *gésier* des Acridiens joue le rôle d'organe d'accumulation de phosphates et d'urates ; compte tenu de l'imperméabilité de sa cuticule aux substances dissoutes, les ions accumulés proviennent de l'hémolymphe. Une telle fonction existe également au niveau de la *valvule proctodéale* des Acridiens, mais ici l'origine des ions ne peut être envisagée en l'absence de données sur la perméabilité cuticulaire de ce court segment proctodéal.

On sait, par contre, que la cuticule proctodéale des autres segments est perméable à l'eau et à certains ions (voir Stobbart et Shaw, 1964), imperméable à l'acide urique (Phillips et Dockrill, 1968). La cristallisation d'acide urique dans la lumière de l'*iléon* des Acridiens permet de confirmer que la réabsorption d'eau a lieu dès ce premier niveau proctodéal (Wigglesworth, 1965). S'il est bien certain que l'acide urique de la lumière proctodéale provient du fluide malpighien et cristallise à la suite d'une réabsorption d'eau et d'un abaissement de pH, il est moins facile de se prononcer quant à l'origine des autres ions, et l'hypothèse d'une intervention d'ions provenant du bol alimentaire ou des sécrétions du mésentéron ne peut être rejetée. Il est toutefois probable que les ions K, Ca, Mg ont une origine excrétrice: on sait que du potassium diffuse à travers la paroi des tubes de Malpighi pour gagner le proctodeum (Ramsay, 1953) ; Phillips (1964) a observé le passage, depuis la lumière des tubes vers

celle de l'iléon, de cristaux qui ne peuvent correspondre qu'aux granules de phosphates de calcium et de magnésium que nous avons décrits. Nos résultats démontreraient ainsi que les phénomènes de résorption ionique par la paroi proctodéale ne concernent qu'une fraction des ions K, alors qu'ils intéressent sans doute la plus grande partie des ions Cl et Na. Il serait souhaitable qu'à l'occasion de recherches de physiologie, la perméabilité de la cuticule aux ions Ca et Mg soit envisagée. Nous ignorons donc si le calcium et le magnésium de la lumière proctodéale représentent la totalité des phosphates d'origine malpighienne. Dans l'état actuel des recherches, le seul fait certain est qu'une très grande quantité de calcium, de magnésium et de potassium se trouve rejetée avec les excréta.

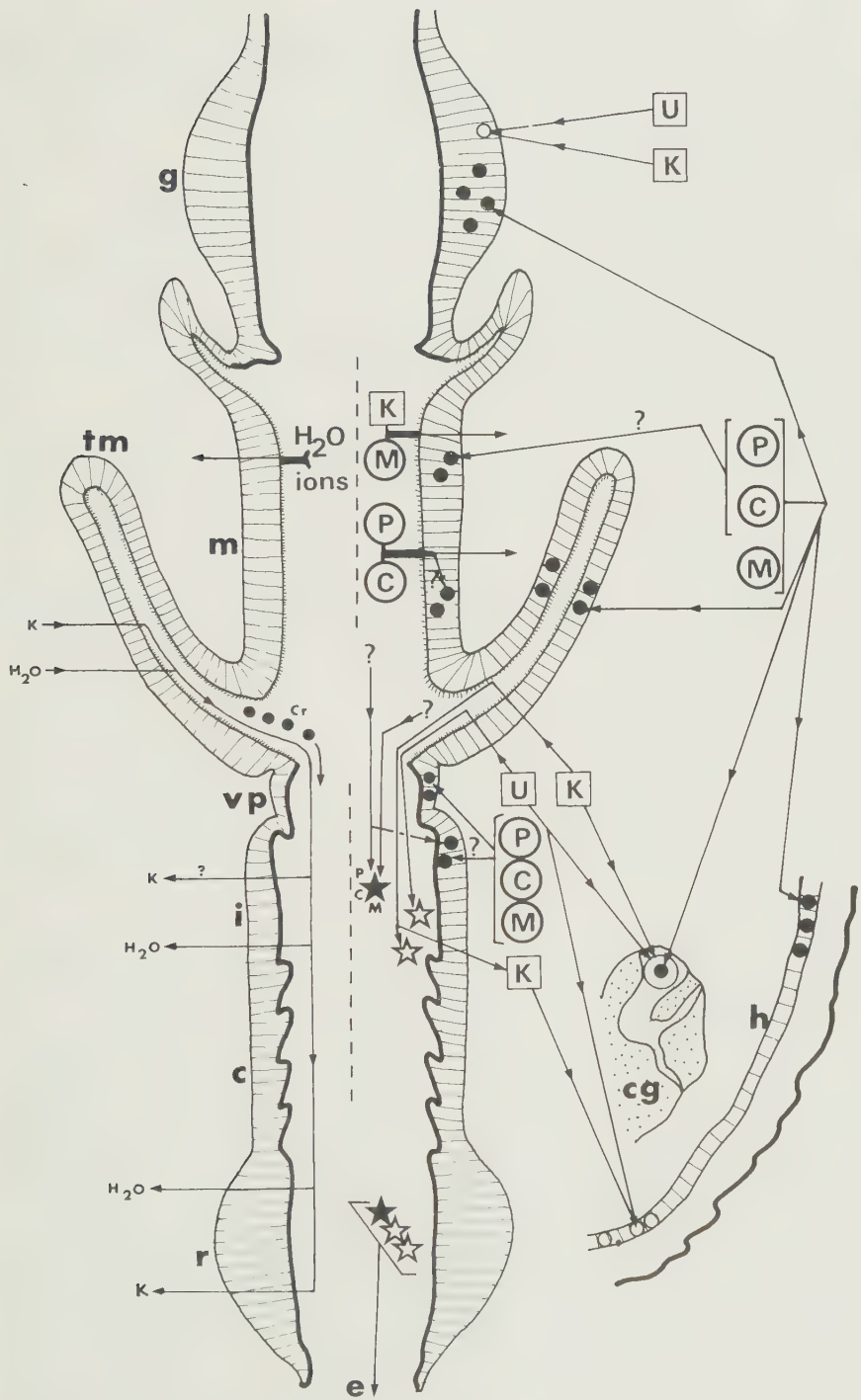
Il ne nous est pas possible d'établir une relation entre ces phénomènes de réabsorption et les accumulations de phosphates inclus dans la paroi de l'iléon. La signification fonctionnelle de ces phosphates ne pourra être envisagée que lorsque des recherches expérimentales démontreront l'origine des ions. Si ceux-ci proviennent de la lumière proctodéale, et non directement de l'hémolymphe, il faut conclure, comme pour le mésentéron, que la précipitation des phosphates dans le cytoplasme concerne un excédent d'ions absorbés par l'apex de la cellule ; dans le cas contraire, il convient d'envisager une certaine analogie fonctionnelle entre la paroi de l'iléon et celle des tubes de Malpighi.

Ces résultats permettent, une fois encore, d'opposer les tubes de Malpighi des Gryllides à ceux des Acridiens car, si l'appareil excréteur a pour rôle, dans les deux cas, de débarrasser l'organisme de ses déchets puriques, le mécanisme diffère pour les deux groupes. Dans les tubes de Malpighi des Acridiens, l'acide urique et le potassium sont éliminés sous forme soluble et seuls les phosphates précipitent. Chez les Gryllides, les urates cristallisent en s'ajoutant aux phosphates. La cristallisation des urates a donc lieu dans le proctodeum dans un cas, dans les tubes de Malpighi dans l'autre cas. Etant donné que la cristallisation de l'acide urique nécessite une grande quantité de potassium, il conviendrait de rechercher par quel mécanisme les Gryllides peuvent réabsorber cet ion

FIGURE 14. Reconstitution du cycle des ions P, Ca, Mg, K et de l'acide urique, dans l'organisme d'un Acridien. Seuls, sont envisagés l'hypoderme (*h*), le corps gras (*cg*), les tubes de Malpighi (*tm*) et le tube digestif (*g*, gésier ; *m*, mésentéron ; *vp*, valvule proctodéale ; *i*, iléon ; *c*, côlon ; *r*, rectum ; *e*, excréta).

A gauche : données de la physiologie, d'après Ramsay (1953), Phillips (1964), Wigglesworth (1965), Stobbart et Shaw (1968), Sauer et Mills (1969). Cr, cristaux (Phillips).

A droite : données complémentaires apportées par l'analyse des dépôts ioniques. Les ions sont représentés par leurs seules initiales (P, C, M, K), l'acide urique par U. Les cercles blancs correspondent aux urates, les cercles noirs aux phosphates ; les cristallisations proctodéales sont représentées par des étoiles.



au niveau du proctodeum : la présence de petites quantités d'acide urique cristallisé en aiguilles dans le rectum des Gryllides montre qu'une fraction de l'acide urique est également éliminée sous forme soluble par les tubes de Malpighi ; ceci permet d'envisager le rejet, vers la lumière proctodéale, d'ions diffusibles et notamment de potassium.

L'existence de dépôts ioniques dans le *chorion des œufs*, sans formation de cristaux ou de concrétions amorphes, conduit à envisager l'incorporation éventuelle des cations dans des composés organiques. Du fait de leur extraction complète par les agents déminéralisants, ces dépôts ioniques correspondent plus vraisemblablement à une véritable minéralisation qui pourrait, comme dans le cas du puparium de *Calliphora*, remplacer un tannage (Fraenkel et Hsiao, 1967).

Quant à la *cuticule*, aucun des ions reconnus dans plusieurs cas par analyse chimique (Richards, 1956 ; Weaver, 1958) n'existe en quantité suffisante pour être décelé par spectrographie ou par cytochimie. De ce fait, nous considérons les résultats positifs que nous avons obtenus pour le magnésium, par la méthode du jaune titan, comme un artéfact.

La présence de quantités importantes de magnésium et de potassium dans les inclusions minérales pose le problème de la signification, pour la *physiologie de l'Insecte*, de cette importante rétention ionique. On sait que les Orthoptères sont caractérisés par une faible teneur des ions K et Mg dans leur hémolymphe (Florkin et Jeuniaux, 1964). L'accumulation de ces ions dans de nombreux organes pourrait être en relation avec le maintien, chez ces phytophages, de la constance cationique du milieu intérieur. Mais les différences dans la teneur en potassium d'un organe de diverses espèces (tubes de Malpighi ou hypoderme), qui traduisent sans doute des différences de teneur en acide urique, dépendent de la position systématique des espèces et non de caractères particuliers du régime alimentaire.

Il y a lieu de noter que les Orthoptères n'accumulent pas les ions Cl et Na, contrairement à d'autres Insectes (Hyménoptères, Jeantet, 1971 ; Dictyoptères, Ballan-Dufrançais, 1970).

Dans la physiologie de l'organisme, le cycle d'un ion ne peut être correctement établi que si sa forme diffusible et sa forme d'accumulation sont envisagées. Le cas du potassium est, à cet égard, très suggestif. Il est bien connu, chez *Schistocerca* ou *Locusta* pour les Orthoptères, que le potassium de l'hémolymphe diffuse, par les tubes de Malpighi, vers la lumière proctodéale où a lieu la réabsorption ; or, dans ces espèces, une grande partie du potassium absorbé par le mésentéron va s'accumuler sous forme d'urate dans le corps gras et l'hypoderme, et sa remise en circulation reste du domaine de l'hypothèse. Dans le groupe voisin des Gryllides, l'étude expérimentale du cycle du potassium, conduite par les méthodes de la physiologie et dans le seul complexe anatomique « hémolymphe », a permis de constater que le potassium est réabsorbé dans le rectum et éliminé dans la lumière proctodéale.

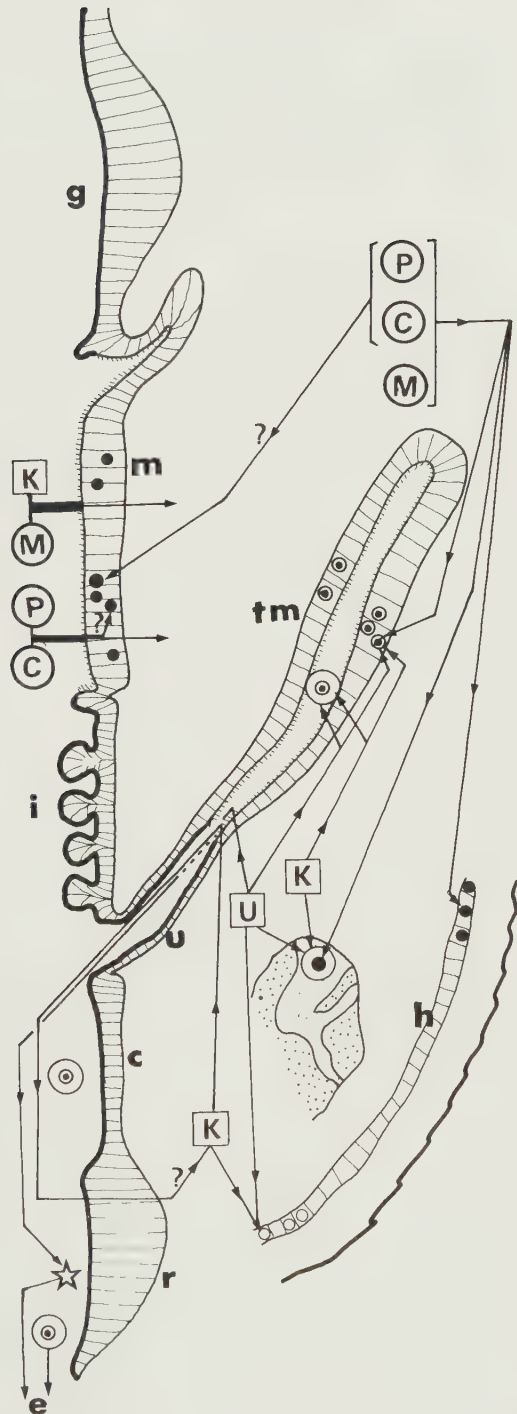


FIGURE 15. Reconstitution du cycle des ions P, Ca, Mg, K, et de l'acide urique, dans l'organisme d'un Gryllide. Mêmes légendes que pour la Figure 14. *u*, urètre.

Malgré l'absence de données physiologiques, nous avons transposé aux Gryllides certains faits qui nous semblent pouvoir être généralisés (absorption des ions par le mésén-téron).

lymphe-tubes de Malpighi-proctodeum », conduirait à négliger non seulement les ions retenus dans les autres organes, mais ceux qui constituent une fraction importante des sphérocristaux des tubes de Malpighi et qui perdent ainsi leur possibilité de diffusion.

CONCLUSION

Sur le plan méthodologique, l'analyse des inclusions minérales comportant un mélange d'ions requiert, pour être complète et valable, la méthode spectrographique. Toutefois, les techniques cytochimiques restent son complément indispensable, notamment en ce qu'elles permettent une localisation précise des ions à l'échelle cytologique. Lorsqu'elles sont associées à des tests d'extraction élective, ces deux groupes de méthodes permettent d'envisager la composition moléculaire des inclusions.

Dans le domaine de la physiologie de l'Insecte, nos résultats conduisent à mettre en évidence une régulation « extra-rénale » de l'équilibre minéral, à soupçonner l'intervention des accumulations ioniques dans la physiologie particulière de certaines structures (chorion de l'œuf), à compléter les données antérieures sur le cycle de certains ions (potassium).

RÉSUMÉ

Les dépôts ioniques de divers organes d'Orthoptères ont été analysés comparativement par spectrographie des rayons X et par cytochimie.

Les résultats permettent de reconsidérer le problème de la spécificité des techniques cytochimiques les plus usuelles, et de la valeur des méthodes de contrôle. Ils soulignent la difficulté d'application de certaines de ces techniques à un même organe d'espèces différentes, ou des organes différents d'une même espèce.

Dans le domaine de la physiologie de l'insecte, les dépôts ioniques représentent des accumulations complexes d'urates de potassium et de phosphates de calcium, magnésium et potassium, parfois associés à des pigments. Le rôle des organes d'accumulation dans le maintien de l'équilibre minéral de l'organisme est discuté.

SUMMARY

A comparison is made of analysis by the electron probe method and by cytochemistry of the ionic deposits in various Orthopteran organs.

The results make it possible to reconsider the problem of the specificity of the most usual cytochemical technics, and of the value of controls. They emphasize that some of these technics may not always be reliable in comparisons of a given organ in different species or of various organs within a species.

With regard to insect physiology, the ionic deposits are complex accumulations of potassium urates and calcium, magnesium, potassium, phosphates, sometimes associated with pigments. The function of these accumulatory organs in the maintenance of the mineral balance is discussed.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERKALOFF A., 1961. Contribution à l'étude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les Insectes. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, **12**, 869-947.
2. FLORKIN M. et JEUNIAUX C., 1964. *The Physiology of Insecta*. Rockstein M., ed. *Acad. Press*, **3**, 109-152.
3. FRAENKEL G. et HSIAO C., 1967. Calcification, tanning and the role of ecdysion in the formation of the puparium of the facefly *Musca autumnalis*. *J. Ins. Physiol.*, **13**, 1387-1394.
4. FURNEAUX P.J.S., JAMES C.R. et POTTER S.A., 1969. The egg shell of the house cricket (*Acheta domesticus*) ; an electron microscope study. *J. Cell Sc.*, **5**, 227-249.
5. FUZEAU-BRAESCH S., 1960. Etude biologique et biochimique de la pigmentation chez un Insecte : *Gryllus bimaculatus*. *Bull. Biol. Fr.-Belg.*, **4**, 526-627.
6. GABE M., 1969. *Techniques histologiques*, Masson, éd., Paris, 1113 p.
7. GALLE P., 1965. Analyse chimique onctuelle des inclusions intra-cellulaires par spectrographie des rayons X. Application à l'étude des cellules rénales. *Thèse*, l'Expansion, éd., Paris.
8. GANTER P. et JOLLES G., 1970. *Histochimie normale et pathologique*. Gauthier-Villars, éd., Paris, 1950 p.
9. GOMORI G., 1953. *Microscopic Histochemistry, Principles and practice*, Chicago Press, éd., 273 p.
10. GURR E., 1958. *Methods of analytical histology and Histochemistry*. Hill, éd., Londres, 327 p.
11. HACMAN R.H. et GOLDBERG M., 1960. Composition of the oothecae of three Orthoptera. *J. Ins. Physiol.*, **5**, 73-78.
12. JEANTET A.Y., 1971. Recherches histophysiologiques sur le développement post-embryonnaire et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). II. Particularités histochimiques et ultrastructurales de l'intestin moyen de *Formica polyctena*. *Z. Zellforsch. und Mikr. Anat.*, **116**, 405-424.
13. LISON L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthier-Villars, éd., Paris, 842 p.
14. MARTOJA R., 1961. Caractères histologiques du segment muqueux de l'appareil excréteur des Orthoptères. *C.R. Acad. Sc.*, **253**, 3063-3065.
15. MARTOJA R. et LAUVERJAT S., 1964. Caractères histochimiques et dimorphisme sexuel du corps gras chez les Insectes Orthoptères. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **89**, 339-383.
16. MARTOJA R., 1966. Sur quelques aspects de la biologie des Orthoptères en relation avec la présence de concentrations microbiennes (bactéries intestinales, rickettsies). *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, N.S., **2**, 1-194.
17. MOSCONA A., 1950. Studies of the egg of *Bacillus libanicus* (Orthoptera, Phasmidae). I. The egg envelopes. *Quart. J. Micr. Sc.*, **91**, 183-193.

18. PEARSE A.G.E., 1961. *Histochemistry, theoretical and applied*. Churchill, ed., London, 998 p.
19. PHILLIPS J.E., 1964. Rectal absorption in the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskal. *J. Exp. Biol.*, **48**, 15-80.
20. PHILLIPS J.E. et DOCKRILL A.A., 1968. Molecular sieving of hydrophilic molecules by the rectal intima of the desert locust (*Schistocerca gregaria*). *J. Exp. Biol.*, **48**, 521-532.
21. RAMSAY J.A., 1953. Active transport of potassium by the Malpighian tubules of insects. *J. Exp. Biol.*, **30**, 358-369.
22. RICHARDS A.G., 1956. Studies on arthropod cuticle. XII. Ash analyses and microincineration. *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, 140-152.
23. SAUER J.R. et MILLS R.R., 1969. Movement of potassium and sodium across the midgut epithelium of the american cockroach. *J. Ins. Physiol.*, **15**, 1489-1498.
24. STOBART R.H. et SHAW J., 1964. *The Physiology of Insecta*. Rockstein M., ed., Acad. Press, **3**, 190-258.
25. WATERHOUSE D.F., 1950. Studies of the physiology and toxicology of blowflies. XIV. The composition, formation, and fate of the granules in the Malpighian tubules of *Lucilia cuprina* larvae. *Austr. J. Sc. Res.*, **B**, **3**, 76-112.
26. WEAVER A.A., 1956. Calcium oxalate crystals in the cuticle of certain insect larvae. *Proc. 10th Intern. Congr. Entomol.*, Montréal, **1**, 535-541.
27. WIGGLESWORTH V.B., 1965. *The principles of insect physiology*. Methuen, ed., London, 741 p.

Manuscrit reçu le 26 novembre 1970.

Planche I

Fig. a. — Corps gras de *Gryllus*. Méthode de Von Kossa sur coupe non hydratée. Remarquer l'abondance des sphérocristaux ; $\times 180$.

Fig. b. — Détail du cliché précédent. Les strates sombres des sphérocristaux correspondent aux phosphates ; $\times 1\,000$.

Fig. c. — Corps gras de *Gryllus*. Méthode de Gomori précédée d'une déminéralisation à l'alcool nitrique ; $\times 250$.

Fig. d. — Corps gras d'*Ephippiger*. Méthode de von Kossa sur coupe non hydratée. Remarquer la grande dispersion des sphérocristaux ; $\times 500$.

Fig. e. — Détail du cliché précédent. Les sphérocristaux sont relativement pauvres en phosphates ; $\times 2\,000$.

Fig. f. — Corps gras de *Schistocerca*. Méthode de Schmorl. Les urates apparaissent en noir dans la bande de corps gras (Cg) ; $\times 350$.

Fig. g. — Tégument des régions latérales souples de l'abdomen d'*Ephippiger*. Trichrome de Prenant-Gabe. L'hypoderme (H) est dépourvu de pigments ; les microcristaux d'urates ne sont pas conservés. C, cuticule ; $\times 500$.

Fig. h. — Même région tégumentaire. Observation au microscope polarisant d'une coupe non colorée. L'ensemble de l'hypoderme est biréfringent ; $\times 300$.

Fig. i. — Même région tégumentaire. Méthode de Schmorl. Forte réactivité des urates de l'hypoderme (en noir), entre la cuticule C et le corps gras (Cg). Noter la réaction faussement positive de la partie superficielle de la cuticule ; $\times 500$.

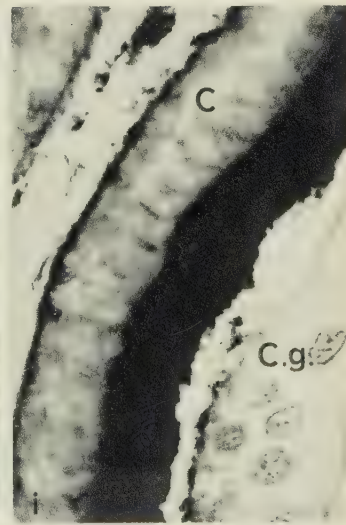
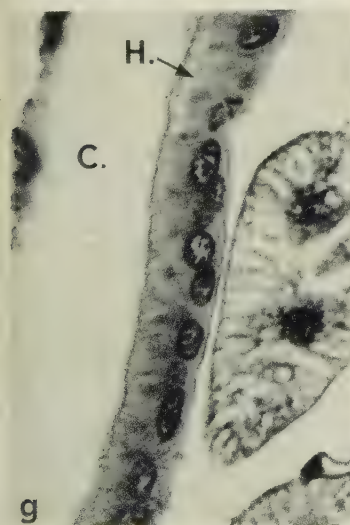
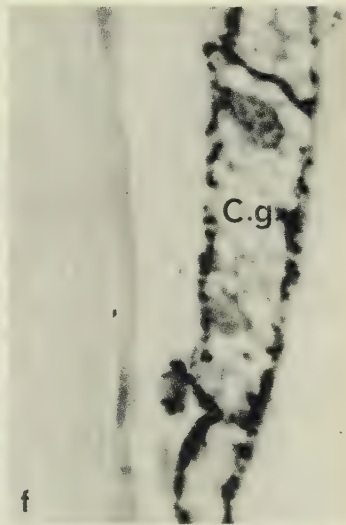
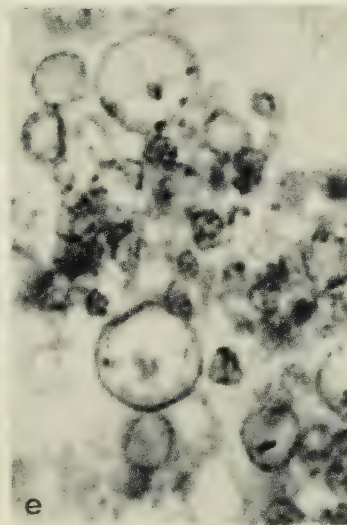
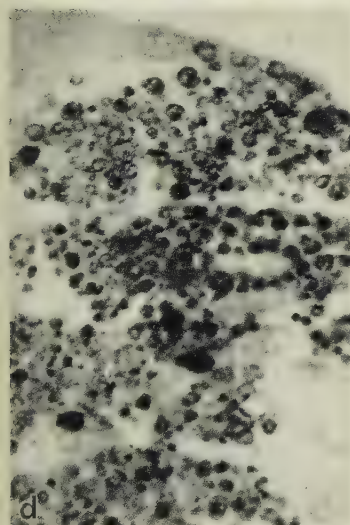
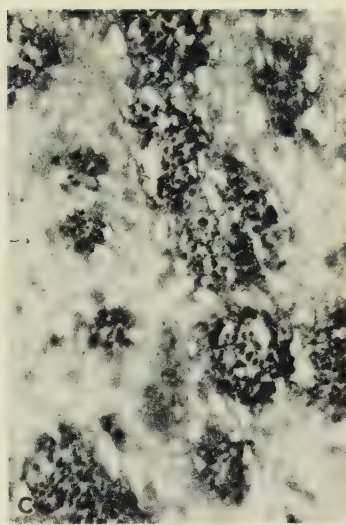
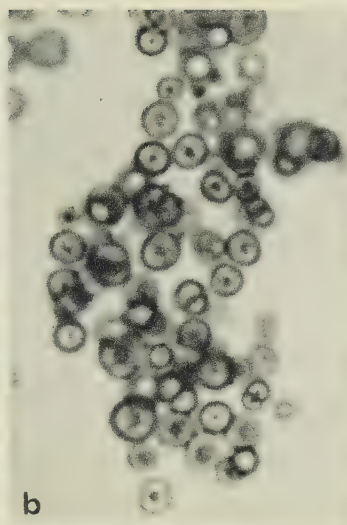
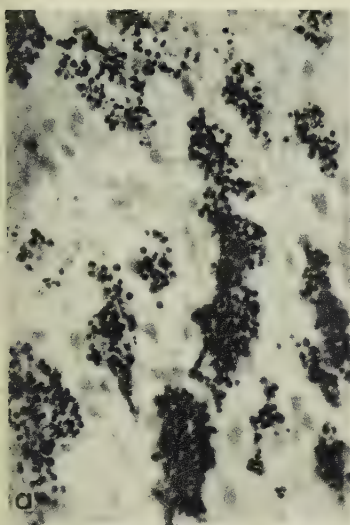


Planche II

Fig. a et b. — Tégument des régions latérales souples de l'abdomen de *Gryllus*.

Fig. a. — Coloration au vert de méthyle-pyronine ; $\times 350$.

Fig. b. — Méthode de von Kossa sans hydratation de la coupe. Sous la cuticule *C*, l'hypoderme est fortement pigmenté, les résultats de la méthode de von Kossa sont illisibles à ce niveau. Noter les sphérocristaux positifs du corps gras (*Cg*) ; $\times 200$.

Fig. c. — Tégument de la région sternale de *Locusta* ; à gauche, examen au microscope polarisant, $\times 600$; à droite en contraste de phases, $\times 1\,000$. Sous la cuticule (*C*) l'hypoderme est biréfringent ; il contient des pigments à la base des cellules (*flèches*).

Fig. d, e et f. — Tubes de Malpighi de *Gryllus*, segment moyen.

Fig. d. — Méthode de von Kossa ; $\times 700$.

Fig. e. — Méthode de Stoelzner ; $\times 500$.

Fig. f. — Méthode de Gomori après déminéralisation. Noter la richesse des cristaux en phosphates, incomplètement révélés (*fig. b*) et leur pauvreté en urates (*fig. f*) ; $\times 700$.

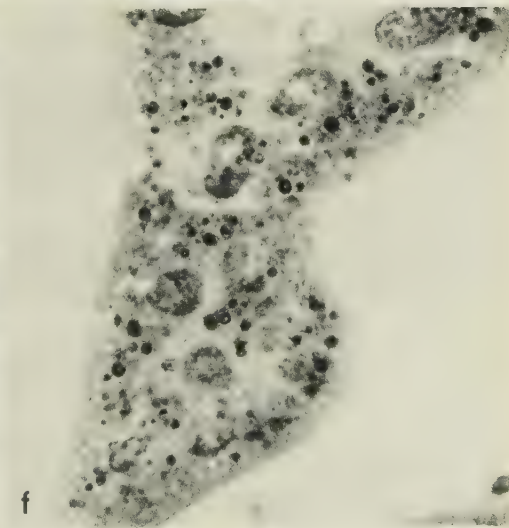
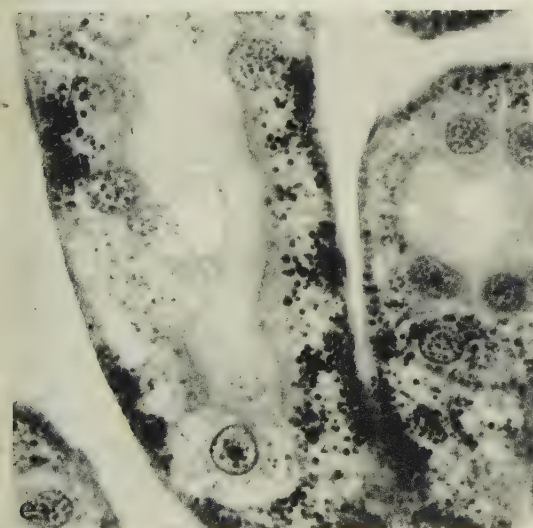
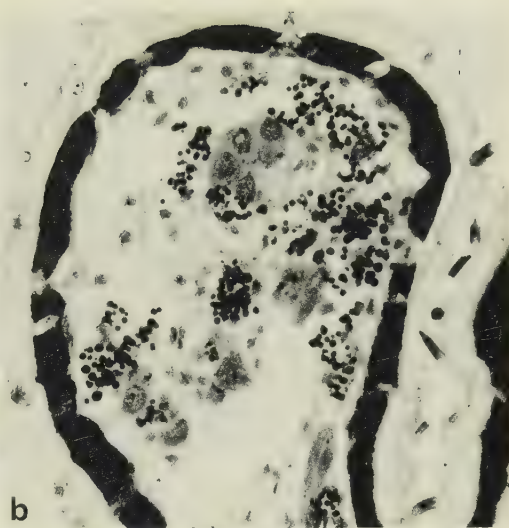
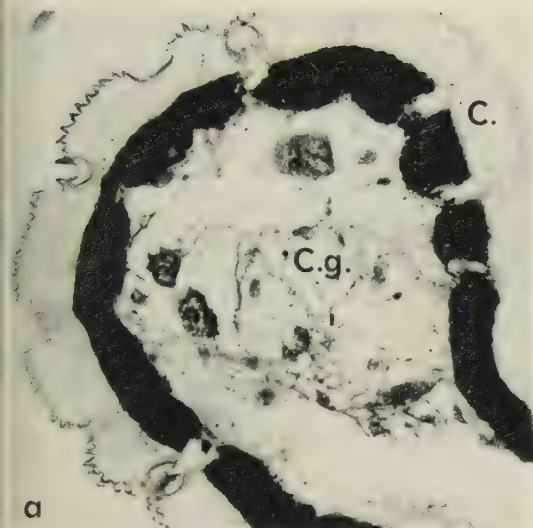


Planche III

Fig. a, b et c. — Tubes de Malpighi de *Gryllus*.

Fig. a. — Technique à l'alizarine. Remarquer l'aspect empâté des cytoplasmes, $\times 850$. Dans l'encart, cristaux de la lumière du segment proximal ; noter les strates non colorées des cristaux ; $\times 1\,100$.

Fig. b. — Coloration au jaune titan. Noter la réactivité des cristaux intracytoplasmiques et de ceux de la lumière des tubes ; $\times 450$.

Fig. c. — Réaction au cobalthexanitrite, observation en contraste de phases. Les sites positifs apparaissent en blanc, ils correspondent aux cristaux de la lumière des tubes, $\times 450$. Dans l'encart, cristaux de la lumière examinés en lumière normale ; noter la bonne localisation du produit de réaction sur les cristaux ; $\times 1\,000$.

Fig. d, e et f. — Tubes de Malpighi de *Locusta*.

Fig. d. — Coloration topographique. Noter la présence de pigments dans certains tubes ; $\times 400$.

Fig. e. — Méthode de von Kossa. Les tubes non pigmentés ne réagissent pas ; $\times 400$.

Fig. f. — Technique à l'alizarine. Même remarque que pour *Gryllus*. Remarquer, dans l'encart, la superposition des granules pigmentaires et des sites positifs ; mais certains grains de pigments ne réagissent pas ; $\times 400$.

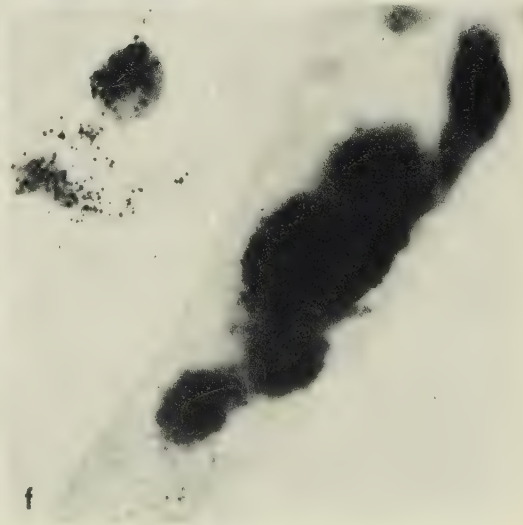
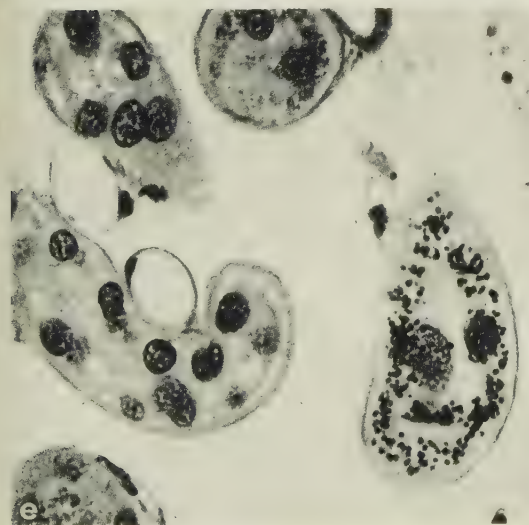
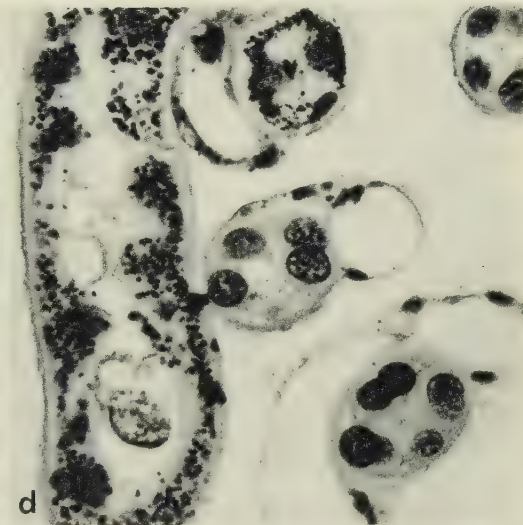
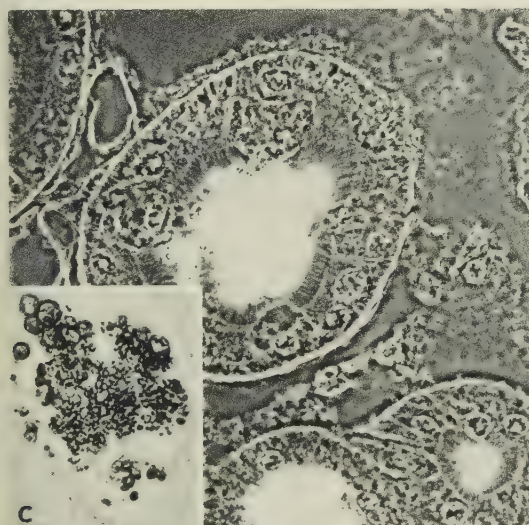
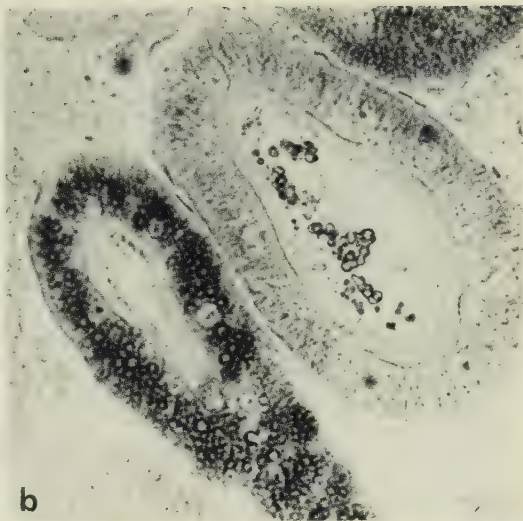
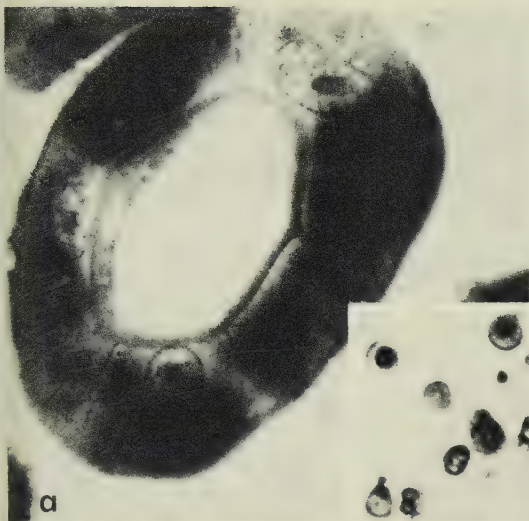


Planche IV

Fig. a. — Tube de Malpighi de *Locusta*. Jaune titan. La réaction est positive au niveau des granules de pigments qui sont décolorés ; $\times 600$.

Fig. b. — Tubes de Malpighi de *Schistocerca*.

A gauche, coloration topographique. Noter l'absence de pigments ; $\times 370$.

A droite, méthode de von Kossa ; $\times 450$.

Fig. c et d. — Dépôts ioniques dans la lumière proctodéale de *Locusta*, au niveau du côlon.

Fig. c. — Coloration à l'hémalun. Le dépôt est formé d'aiguilles d'acide urique, ayant résisté à la coloration. Seule, la compacité de ce dépôt lui confère une grande opacité ; il n'est pas coloré par l'hémalun ; $\times 130$.

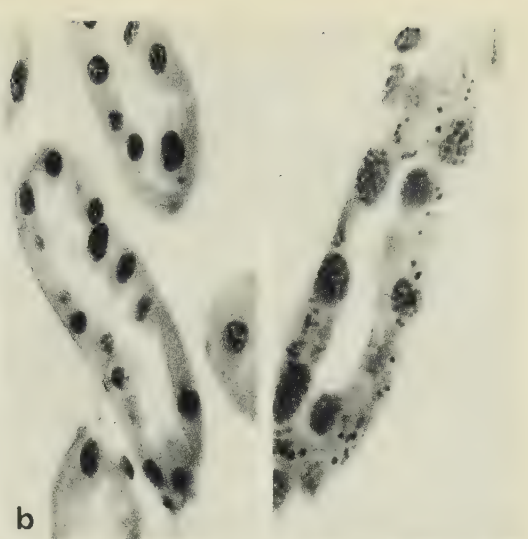
Fig. d. — Observation au microscope polarisant ; $\times 180$.

Fig. e. — Epithélium de l'iléon de *Locusta*. Méthode de von Kossa après décalcification par l'eau nitrique pendant 1 heure. Noter la persistance de la réactivité des cristaux de phosphates. Coloration de fond au rouge solide-picroindigocarmin ; $\times 500$.

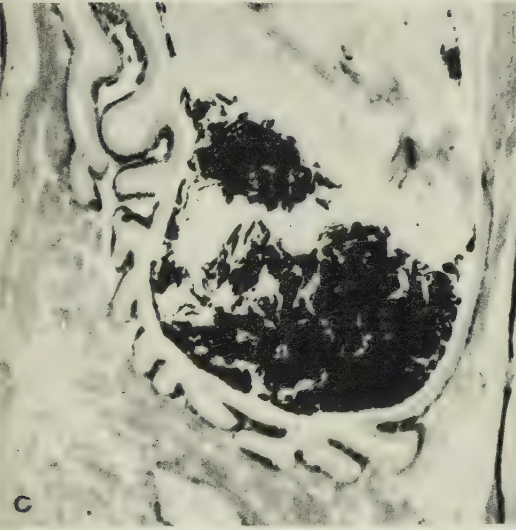
Fig. f. — Chorion de l'œuf de *Pholidoptera* (Tettigonide). Méthode de von Kossa. Le chorion (*Ch*) est accidentellement décollé du vitellus (*V*). Noter sa forte réactivité ; $\times 500$.



a



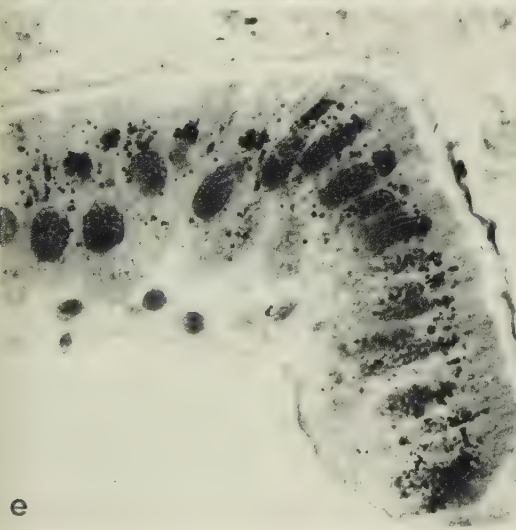
b



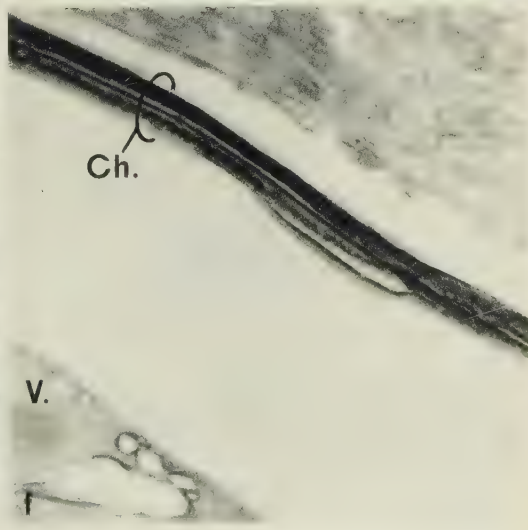
c



d



e



V.

PHYSIOLOGIE DES INSECTES. — *Données préliminaires sur l'état physique des constituants de sphérocristaux situés dans des organes participant au catabolisme purique des Insectes.* Note (*) de M^{me} **Christiane Ballan-Dufrançais** et M. **Serge Fichelson**, présentée par M. Pierre-Paul Grassé.

Les concrétions puriques des Insectes contiennent un mélange de sels amorphes (urates, phosphates) et de composés cristallisés (xanthine, calcite, parfois quartz) qui, dans cette classe, n'avaient jamais été décelés sous forme cristalline.

L'analyse, par spectrographie des rayons X et par cytochimie, de concrétions situées dans divers organes d'Insectes, a permis de déterminer la composition élémentaire de ces structures [(¹), (²), (³)]. Mais ces méthodes s'avèrent impuissantes à identifier les liaisons qui existent entre les divers groupements ou ions, et ce n'est que sur la base d'arguments indirects (corrélations entre les teneurs en anions et en cations, caractères de solubilité) que certaines liaisons ont été proposées [(¹), (²), (³)]. Il nous a donc paru intéressant d'établir, par une méthode complémentaire, la nature exacte des sels accumulés ; la radiocristallographie pouvait permettre de résoudre ce problème, au moins en ce qui concerne les composés cristallisés. Les premiers résultats, inattendus, nous ont conduits à entreprendre une étude systématique des organes connus pour accumuler de l'acide urique sous forme cristalline : tissu adipeux, tubes de Malpighi, glandes annexes de l'appareil génital mâle [(¹), (⁴), (⁵)].

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — L'analyse par diffraction des rayons X a porté sur les organes suivants : corps gras (*Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, *Blabera fusca*, *Gryllus bimaculatus*, *Locusta migratoria migratorioides*), tubes de Malpighi (*Gryllus bimaculatus*, *Rhodnius prolixus*), utricules (*Blatella germanica*). Le matériel, prélevé *in vivo*, puis desséché en étuve à 37 °C, a été broyé et introduit dans un tube en verre de Lindemann. La durée d'exposition aux rayons X a varié de 15 à 23 h, avec une intensité de 20 mA, sous une tension de 35 kV, les raies K α du cuivre étant sélectionnées par un filtre de nickel. Dans certains cas, le matériel a été traité par l'eau nitrique avant d'être réduit en poudre ; dans d'autres cas, le prélèvement a été effectué sur des pièces fixées selon les techniques histologiques habituelles (mélange de Carnoy : alcool 100°, chloroforme, acide acétique, 6/3/1) puis conservées dans l'alcool butylique. A titre de référence, une analyse identique a été faite sur des concrétions du tissu conjonctif d'un Mollusque (*Pomatias*) dans lesquelles l'acide urique et la xanthine avaient été détectés chimiquement (⁶). L'analyse par spectrographie des rayons X à la microsonde de Castaing a été effectuée selon le procédé précédemment décrit (²).

RÉSULTATS. — Dans tous les organes analysés à l'état frais (corps gras, tubes de Malpighi, utricules), les spectres obtenus par diffraction des rayons X (*pl.*) ne sont jamais ceux de l'acide urique ou d'un urate, mais correspondent à ceux de la xanthine, de la calcite et, dans les seuls tubes de Malpighi (*Gryllus*), à de l' α -quartz (tableau I).

TABEAU I. — *Interprétation des diagrammes obtenus par radiocristallographie d'échantillons témoins purs et de certains organes d'Insectes*

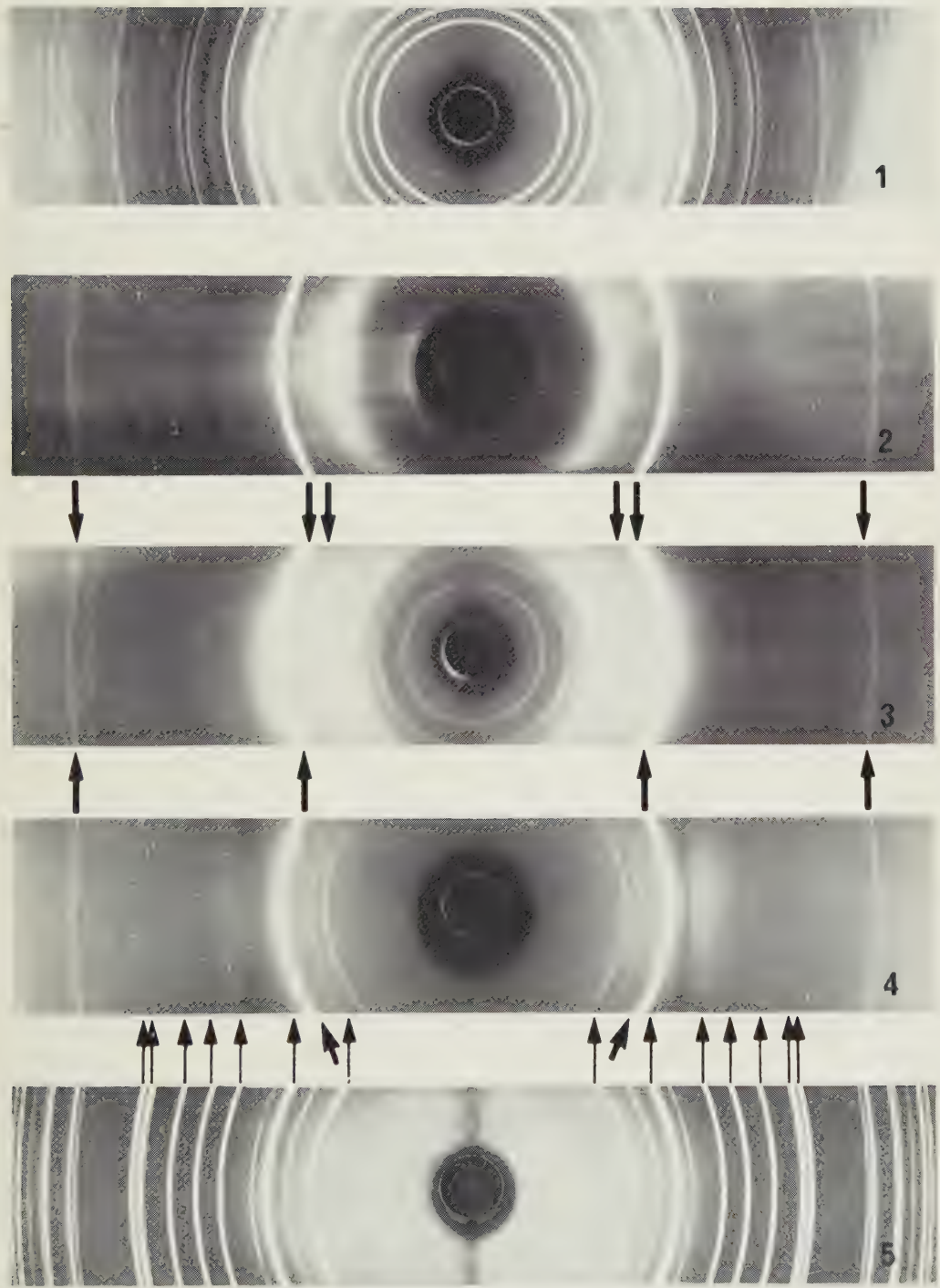
Colonne de gauche : angles de diffraction des raies. Lorsqu'une raie est susceptible de faire partie du spectre d'un témoin, les valeurs apparaissent en italique pour la calcite ou avec un signe distinctif : * pour la xanthine et ° pour le quartz. *Colonne de droite* : intensités relatives. Pour les témoins, les valeurs I/I₀ sont celles du fichier ASTM. Pour le matériel biologique, l'intensité de chaque raie est établie proportionnellement à celle de la raie la plus intense du diagramme. 3+ signifie +++.

Acide urique		Xanthine		Calcite		Quartz		T. Malp. Grillon		T. Malp. Rhodnius		Utricule Blatella		C. gras Blatella		C. gras Grillon	
		1,54	10	1,52	5	1,54	15	1,51	±			1,52	±				
		1,62	10	1,60	8			1,61*	±			1,62*	2+	1,60*	3+	1,60*	±
						1,81	17	1,81°	+	1,83	±						
				1,87	17			1,86	+			1,86	+	1,87	+		
				1,91	17			1,91	+			1,92	+	1,91	+		
				1,93	5												
				2,09	18	2,12	9	2,09	+			2,09	+	2,09	+	2,09	±
										2,21	2+						
2,30	10	2,30	10	2,28	18	2,28	12	2,27*°	+			2,28*	+	2,27*	+		
2,34	20																
2,42	20																
2,47	20	2,50	10	2,49	14	2,46	12	2,49*°	±			2,49*	±	2,48*	±		
2,59	60																
2,81	40	2,83	10							2,79	±						
2,90	70																
3,02	10			3,03	100			3,03	3+	3,02	+	3,02	2+	3,03	2+	3,02	+
3,12	100							3,13	+								
		3,17	100					3,19*	4+	3,20*	4+	3,20*	4+	3,19*	4+	3,19*	4+
3,22	80																
3,30	30					3,34	100	3,35°	2+								
3,44	10																
3,59	10	3,58	10									3,60	3+	3,56*	+		
3,75	10													3,70	+		
				3,86	12											3,87	±
3,91	90																
														4,15	2+		
		4,54	10			4,26	35							4,53*	2+		
4,98	90	8,82	10									8,84*	±	8,84*	±		

D'autres raies, non identifiées, peuvent coexister avec le spectre des composés précédents. Des temps d'exposition prolongés étant nécessaires pour obtenir un diagramme, les substances cristallisées sont vraisemblablement très peu abondantes. La fixation préalable du matériel ne provoque pas de modifications dans la composition des concrétions. Par contre, après traitement à l'eau nitrique (corps gras de *Blatella*) le spectre de l'acide urique apparaît très nettement et la xanthine est conser-

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Diagrammes de diffraction des rayons X (Debye-Scherrer) : Témoins. 1. Acide urique ; 3. Xanthine ; 5. Calcite. — Organes. 2. Corps gras de *Blatella* ; 4. Tissu conjonctif de *Pomatias*.
Un halo de diffusion important, dû probablement à la forte teneur en protéines des échantillons, gêne la mise en évidence de certaines raies sur les reproductions photographiques. Remarquez les raies les plus intenses de la xanthine (→), et l'absence de concordance avec le spectre de l'acide urique ; la présence de raies de calcite (↔) peu visibles en 2, plus nettes en 4. Ce dernier diagramme (*Pomatias*) est en fait pratiquement identique à celui des tubes de Malpighi du grillon ; la première raie du quartz (→) est seule discernable sur la photographie.





vée, alors que la calcite est solubilisée. Il convient de comparer ces résultats à ceux des méthodes cytochimiques et de la micro-analyse par spectrographie des rayons X. Ces méthodes, appliquées à des coupes n'ayant subi aucune extraction et à des coupes témoins obtenues par déminéralisation ou par extraction des urates, nous avaient permis de détecter dans la plupart des organes étudiés de très importantes quantités de potassium et d'acide urique, associés sous forme d'urates, et des quantités plus variables de calcium, de magnésium et de phosphore minéral [(¹), (²), (³)]. Le potassium, le calcium et le phosphore ont été retrouvés, avec des teneurs relatives assez voisines, au niveau de concrétions malpighiennes (*Rhodnius*) ; du silicium a été décelé dans les tubes de Malpighi (*Gryllus*) (tableau II).

TABLEAU II. — Teneur en quelques éléments des organes étudiés. Les valeurs sont exprimées en nombre de chocs par seconde et ne sont comparables que pour un même élément

			K	Ca	Mg	P	Si
Corps gras	<i>Blatella</i>	(3)	1 300	20	0	20	
	<i>Periplaneta</i>	(3)	250	0 à 20	0	0 à 60	
	<i>Blabera</i>	(3)	150	0 à 25	0	20 à 60	
	<i>Locusta</i>	(2)	100	250	50	200	
	<i>Gryllus</i>	(2)	500	400	40	200	
Tubes de Malpighi	<i>Gryllus</i>	(2)	180	500	40	250	15
	<i>Rhodnius</i>		100	15	traces	5	
Utricules.....	<i>Blatella</i>	(1)	450	70	180	150	

Echantillons de référence : Mg pur 5 000 ; Si pur 10 000 ; Ca (os de grenouille) 4 000 ; K (nitrate de potassium) 4 000 ; P (phosphate disodique) 2 500. Cristaux de spectrographes utilisés : PET, pour Ca-K ; KAP pour Mg-P-Si.

DISCUSSION. — On sait que les urates, mis en évidence par cytochimie [(¹) à (⁴)] ou par chromatographie [(¹), (⁵), (⁷)], s'accumulent dans les sphérocristaux. Mais ils ne diffractent les rayons X que si un traitement préparatoire (eau nitrique) les conduit à l'état cristallin. Il faut donc conclure que, contrairement à une opinion courante, les urates n'existent pas sous forme cristallisée dans les concrétions des Insectes. Dans le corps gras de *Leucophaea maderae*, les techniques électrophorétiques ont d'ailleurs permis de démontrer la liaison de ce catabolite azoté avec des acides aminés [Hopkins et Logfren, 1968, cité dans (⁵)]. En outre, la radiocristallographie ne nous a pas permis de retrouver des phosphates de calcium ou de magnésium. L'ensemble de ces données suggère donc que l'accumulation des composés les plus abondants a lieu sous forme de sels amorphes (urates de potassium, phosphates de calcium et de magnésium), les techniques utilisées ne nous permettant pas de préciser les types de liaisons qu'ils sont susceptibles de contracter avec le stroma glycoprotéique. La *xanthine* a été rarement signalée chez les Insectes (⁵). Elle a été caractérisée par voie chimique chez un Mollusque (⁶) dont les concrétions contiennent effectivement de la xanthine cristallisée ; les résultats de recherches en cours permettent de penser qu'elle n'y existe qu'en très faibles quantités, comme le suggèrent les données de la radio-cristallographie. Son accumulation sous forme cristalline confirme par ailleurs que la dégradation des déchets puriques peut être partiellement stoppée avant la formation d'acide urique. L'accumulation de *calcite* est en accord avec les résultats de la

micro-analyse, le calcium ayant été détecté dans tous les organes étudiés. Toutefois, bien que les teneurs en calcium puissent présenter de grandes variations (tableau II), les spectres obtenus pour des temps d'exposition identiques (22 h) sont souvent d'intensités faibles : le calcium peut donc être partiellement stocké sous une autre forme, en particulier celle de phosphates. La calcite n'a, à notre connaissance, pas encore été signalée chez les Insectes, alors que la vatérite est connue dans le tissu adipeux ⁽⁸⁾. Mais il faut noter que la diffraction des rayons X reste une technique peu utilisée dans cette classe ; elle a permis de déceler de l'oxalate de calcium dans les glandes pseudocollétériques des blattes ⁽⁹⁾ et dans les tubes de Malpighi du ver à soie ⁽¹⁰⁾. Aucun de ces deux composés ne s'accumule sous forme cristalline dans les organes étudiés ici. La présence de *quartz* dans les tubes de Malpighi du grillon est difficile à interpréter, car si l'on excepte les apports exogènes [empoussiérages bronchiques ⁽¹¹⁾], la silice est mal représentée dans le monde vivant. Elle a un rôle de soutien chez quelques Protozoaires (Radiolaires, Foraminifères), chez des végétaux (Equisétales, Graminées), chez quelques Eponges et certains Bryozoaires ⁽¹²⁾. Le silicium a d'autre part été décelé par micro-analyse dans des tissus de divers Invertébrés ⁽¹³⁾ ; nous l'avons retrouvé dans les tubes de Malpighi du grillon et dans d'autres organes où il se trouve également à l'état de quartz (iléon, mésentéron, inédit). Il semble donc que ce composé puisse s'accumuler assez fréquemment en formant de la silice, sans pour autant être impliqué dans la constitution d'un système squelettique.

En résumé, alors que la biréfringence des sphérocristaux de certains organes d'Insectes riches en acide urique ou en urates laissait penser que ces déchets puriques s'accumulaient sous forme cristalline, il apparaît que les composés les plus abondants (urates de potassium et sels minéraux variés) sont stockés à l'état amorphe et que seuls des composés présents en faibles quantités (xanthine, calcite et parfois quartz) sont dans un état cristallin. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez un Crustacé (*Orchestia*) riche en sphérolithes biréfringents, dans lesquels les carbonates amorphes prédominent sur la calcite ⁽¹⁴⁾.

(*) Séance du 7 janvier 1974.

Recherches effectuées dans le cadre de la RCP n° 162 du CNRS.

(1) C. BALLAN-DUFRAÎÇAIS, *Z. Zellforsch.*, 109, 1970, p. 336-355.

(2) C. BALLAN-DUFRAÎÇAIS et R. MARTOJA, *J. Micr.*, 11, 1971, p. 219-248.

(3) C. BALLAN-DUFRAÎÇAIS, *La Cellule* (sous presse).

(4) V. B. WIGGLESWORTH, *Principles of Insect Physiology*, Methuen, Londres, 1965.

(5) J. J. CORRIGAN, in : *Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism*, Academic Press, Londres et New York, 1, 1970, p. 388-488.

(6) L. MERCIER, *Bull. Scient. Fr. Belg.*, 45, 1911, p. 15-26.

(7) P. RAZET, *C. R. Soc. Biol.*, 164, 1970, p. 2627-2629.

(8) M. PRENANT, *Biol. Rev.*, 2, 1927, p. 365-393.

(9) B. STAY, A. KING et L. ROTH, *Ann. Ent. Soc. Am.*, 53, 1960, p. 79-86.

(10) D. J. TEIGLER et H. J. ARNOTT, *Nature*, 235, 1972, p. 166-167.

(11) J. P. BERRY, P. HENOC, P. GALLE et R. PARIENTE, *J. Micr.*, 11, 1973, p. 1803-1814.

(12) C. L. PROSSER et F. A. BROWN, *Comparative Animal Physiology*, Saunders, Philadelphie, 1961.

(13) R. MARTOJA et M. MARTOJA, *Comptes rendus*, 274, Série D, 1973, p. 2951-2954.

(14) F. GRAF, Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodes *Orchestia* et *Niphargus*, Thèse, Dijon, 1969.

Laboratoire d'Histophysiologie des Insectes,
Université Paris-VI, 12, rue Cuvier, 75005 Paris ;
Laboratoire de Physique des Systèmes et des Structures Biologiques,
Université Paris-VII, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.

Données cytophysiologiques
sur un organe excréteur particulier d'un insecte,
Blatella germanica L. (Dictyoptère)

CHRISTIANE BALLAN-DUFRANÇAIS*

Faculté des Sciences de Paris, Laboratoire de Biologie Animale C, Paris V^o
Laboratoire de Microscopie Electronique appliquée à la Biologie, Paris VI^o
Centre de Recherche de Cytopathologie rénale, Paris XV^o

Reçu le 31 Mars 1970

* Avec la collaboration technique de M^{me} C. Davy.

Cyto-Physiological Observations on a Peculiar Excretory Organ in the Insect *Blatella germanica* L.

Summary. The Utricles, male accessory glands of *Blatella germanica* are both excretory and secretory organs. They are formed by a simple epithelium composed of one type of cells which performs those two functions. The endoplasmic reticulum plays an important role in the elimination of substances — either in solution or crystallized — from the haemolymph. The excretion of urates is initiated in less than 15 mn, crystallisation in less than 3 h. The concretions include numerous concentric strata which contain uric acid and a number of ions: Mg, K, Ca, P, Na, Cl, S, and Cu.

A morphological and physiological comparison has been envisaged between the Utricles and the Malpighian tubules; also the ionic constitution of the concretions is compared with the composition of other excretory or accumulatory organs.

Key-Words: Excretory organs — Male accessory glands — Insects — *Blatella germanica* — Cytophysiology.

Résumé. Les utricules, glandes annexes de l'appareil génital mâle de *Blatella germanica*, constituent un organe à la fois excréteur et sécréteur. Ils comportent un épithélium simple, formé d'un seul type de cellules qui cumulent ces deux fonctions. Le réticulum endoplasmique a un rôle primordial dans l'élimination des substances provenant de l'hémolymphe et qu'il transporte vers la lumière sous forme dissoute ou après cristallisation. L'excrétion des urates s'effectue en moins de 15 mn, la cristallisation en moins de 3 h. Les sphérocristaux sont constitués de plusieurs couches concentriques. Ils contiennent des urates et divers ions: Mg, K, Ca, P, Na, Cl, S et Cu. La structure et la fonction des utricules sont comparées à celles des tubes de Malpighi, la composition ionique des cristaux à celle de cristaux d'autres organes d'excrétion ou d'accumulation.

L'étude histologique des glandes annexes mâles de *Blatella germanica* a permis de reconnaître huit groupes glandulaires dont les diverses sécrétions, de nature glycoprotéique, participent à l'élaboration d'un spermatophore (Ballan-Dufrançais, 1968). L'un de ces groupes est représenté par un ensemble de 5 à 6 «utricules» qui contiennent, outre des sécrétions glycoprotéiques, un très grand nombre de sphérocristaux riches en acide urique.

Il était intéressant de préciser la morphologie de ces utricules, de rechercher la composition des cristaux ainsi que leur origine et leur mode de formation, et de comparer ces organes à des appareils excréteurs plus classiques (tubes de Malpighi). Ces recherches ont été conduites par application de techniques diverses: étude ultrastructurale, analyse ionique et déplacement de traceurs radioactifs.

Techniques

Pour l'étude ultrastructurale, les utricules ont été fixés au glutaraldéhyde à 4% tamponné au cacodylate à pH 7,4 puis postfixés au tetroxyde d'osmium à 2% tamponné au véronal sodique; d'autres pièces ont été fixées au tetroxyde d'osmium seul. Le matériel a été inclus dans l'épon-araldite et les coupes contrastées à l'uranyle-plomb. Les phosphates et carbonates de calcium ont été révélés par les méthodes à l'acétate de plomb (Carasso et Favard, 1966) et au nitrate de cobalt (Fauré-Fremiet et al., 1968).

Les carbonates ont également été recherchés, *in vitro*, sur le contenu des utricules d'une vingtaine de blattes, selon la technique employée par Graff (1968).

L'analyse chimique ponctuelle par spectrographie des rayons X a été faite sur des frottis secs d'utricules, sur des coupes à la paraffine provenant de pièces fixées au Carnoy et sur des coupes semi-fines (après double fixation glutaraldéhyde-osmium). Elle a porté sur de nombreux éléments de la classification de Mendeleiev.

Dans la recherche des voies d'excrétion, un isotope radioactif, l'acide urique- ^{14}C , a été utilisé. Le protocole expérimental a été le suivant:

1. injection dans l'hémolymphe, à l'aide d'une micropipette perforant le tégument d'une quantité indéterminée mais constante d'isotope.
2. prélèvement des utricules 15 mn, 1 h, 3 h et 72 h après l'injection. A chaque temps correspond un lot de 5 individus.
3. lavage des organes dans du levulose.
4. isolement, par centrifugation différentielle, des sphérocristaux et de la phase soluble.
5. chromatographie des différentes phases, sur papier Whatmann n° 1, avec un solvant ascendant (n butanol — eau — benzène — méthanol — 1/1/1/2).
6. autoradiographie par contact avec une émulsion photographique (Kodirex Kodak), pendant 20 jours.
7. Comparaison des Rf des spots radioactifs et du spot de l'acide urique, révélé par méthode chimique sur le chromatogramme (Ballan-Dufrançais, 1968).

Le même protocole, à l'exception du 4., a été appliqué aux tubes de Malpighi, aux excréta et à des prélèvements d'hémolymphe. Dans tous les cas les résultats obtenus ne peuvent avoir qu'une valeur qualitative.

Résultats

I. Données ultrastructurales

L'étude ultrastructurale a porté sur des imago d'âge connu. A la mue imaginale, les tubes sont encore juvéniles: leur diamètre est faible ($60\ \mu$), la paroi relativement épaisse, la lumière étroite et vide. Cinq jours plus tard, leur développement maximum est atteint: diamètre $300\ \mu$, paroi mince, lumière volumineuse emplie de sécrétions et de sphérocristaux.

A tous les stades et quel que soit le niveau, la paroi est constituée d'une gaine conjonctive et d'un épithélium simple, à un seul type cellulaire, qui subit peu de modifications au cours de la maturation (fig. 1).

1. Paroi des Utricules

La gaine conjonctive est constituée d'une couche externe, finement granuleuse et stratifiée, qui peut soit entourer des cellules musculaires, des hémocytes, des cellules conjonctives dispersées et des trachéoles (fig. 1, 3), soit être directement au contact de la basale (fig. 2). Cette dernière ($0,15$ à $0,30\ \mu$) est granulo-fibreuse et supporte l'épithélium dont les cellules ont toutes les mêmes caractères (fig. 1—3).

La membrane cellulaire présente des différenciations basales, latérales et apicales qui confèrent une polarité aux cellules.

Dans la région basale (fig. 1—3) elle forme de très nombreuses invaginations orientées parallèlement à l'axe cellulaire et dont la hauteur peut atteindre le

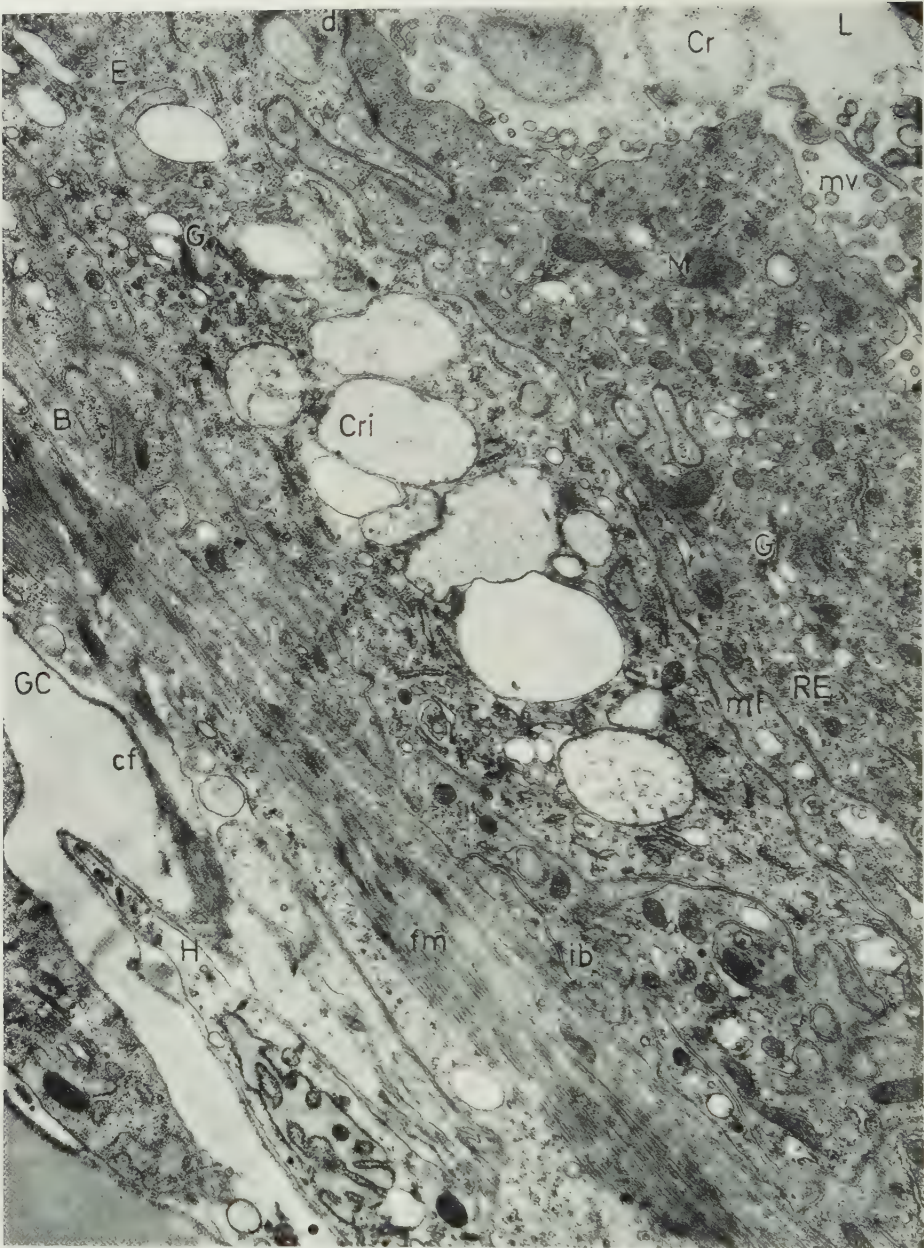


Fig. 1. Vue générale de la paroi des utricules d'un imago jeune ($\times 15000$). L'une des deux cellules épithéliales contient de nombreux sphérules intracytoplasmiques *Cr.i.* Le cytoplasme est dense et riche en organites

tiers de celle de la cellule: les compartiments intracellulaires qu'elle délimite sont riches en mitochondries et en ergastoplasme: l'espace intercellulaire, toujours clair à ce niveau, reste de taille constante et la basale n'y pénètre pas.

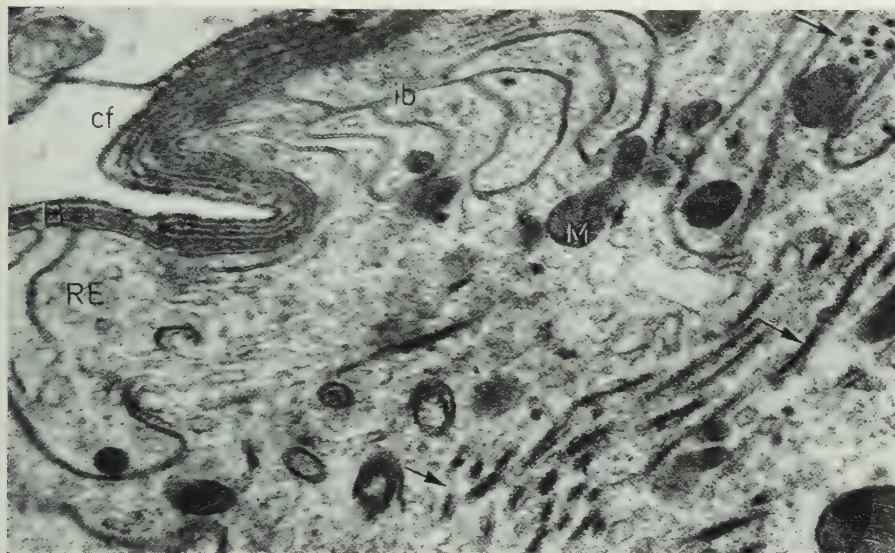


Fig. 2. Détail de la région basale d'une cellule d'imago âgé ($\times 22750$). La gaine conjonctivo-musculaire est réduite aux fibres conjonctives *cf*. La membrane plasmique forme de nombreuses invaginations basales *ib*. Remarquez la présence d'un matériel opaque aux électrons dans certaines citernes ergastoplasmiques (flèches)

Dans les parties latérales des cellules, les membranes forment des replis contournés servant à l'ancrage entre cellules voisines; l'espace intercellulaire présente sur une partie de sa hauteur un desmosome cloisonné puis un desmosome apical (fig. 6, d) du type *zonula adhaerens* (espace intercellulaire 200 Å).

L'apex cellulaire, quant à lui, forme parfois des dépressions et même des cryptes.

Les microvillosités, flexueuses et irrégulières, sont nombreuses et assez serrées notamment dans certaines cryptes (fig. 6); mais elles peuvent disparaître presque complètement à d'autres niveaux (fig. 1), par exemple lorsque des sphérules de la lumière, proches de la paroi, les rejettent latéralement. Leur hauteur varie de 0,5 à 2,5 μ tandis que leur épaisseur est plus constante (0,13 μ). Leur paroi est parfois recouverte de fins filaments rayonnants assez irréguliers, dont l'interprétation est rendue délicate par la présence de sécrétions dans la lumière. L'intérieur de ces microvillosités, constitué de fibrilles longitudinales à disposition radiaire, est fréquemment parcouru par un canalicule axial, pouvant former une petite ampoule apicale renflée, et qui représente le prolongement agranulaire de saccules ergastoplasmiques (fig. 7a). Il faut noter que les microvillosités, parfois fourchues, ne sont jamais anastomosées, ne contiennent pas de mitochondries, et qu'aucune zone fibreuse n'est visible à leur base.

Entre les microvillosités, la membrane plasmique est parfois creusée de petites invaginations à contenu dense, dont l'extérieur est hérissé et qui semblent provenir de l'éclatement de vésicules revêtues¹ (fig. 7b).

La plupart des organites ne présentent aucune originalité. Il n'existe qu'un noyau par cellule; il est volumineux, ovoïde, central et d'aspect classique; le

1 Les «coated vesicles» des auteurs anglo-saxons.

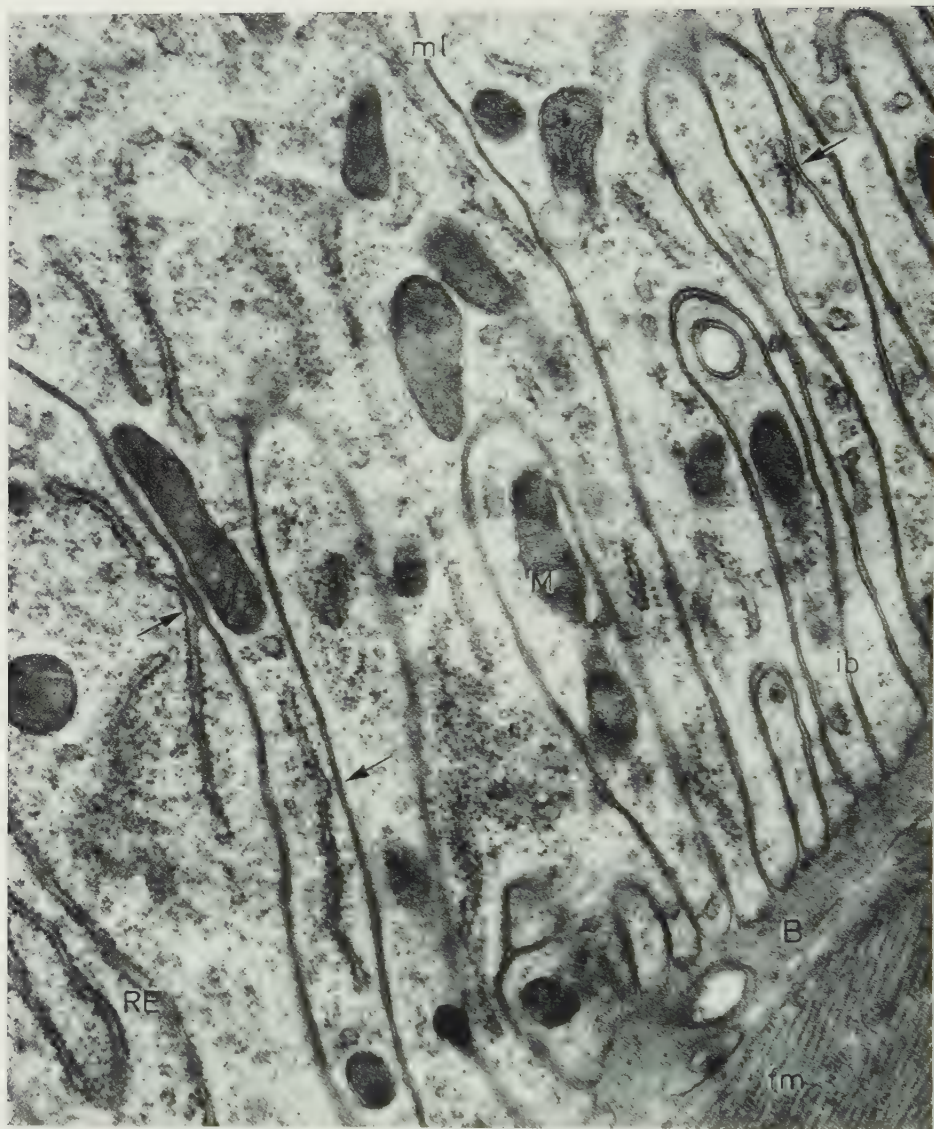


Fig. 3. Invaginations basales de la membrane plasmique ($\times 35000$). Le réticulum endoplasmique est fréquemment en contact étroit avec la membrane plasmique (flèches)

nucléole est bien développé, surtout dans les stades jeunes où il forme des replis lamelleux. Le noyau peut cependant être parfois lobé, et le cytoplasme situé dans les replis est alors particulièrement riche en ribosomes libres et en ergastoplasme formant des figures myéliniques. Les ribosomes sont d'ailleurs nombreux dans tout le cytoplasme, surtout après la mue, et forment alors des polysomes. Les mitochondries (0.5 à 1.5μ) nombreuses elles aussi sont polymorphes et ont

toujours une matrice opaque et des crêtes transversales. Elles sont plus abondantes près de la membrane plasmique, en particulier le long des invaginations de la membrane basale (fig. 2, 3).

Les dictyosomes sont fréquents près du noyau et de la zone apicale mais leur nombre varie en fonction du cycle cellulaire. Ils comprennent des saccules étroits, empilés ou anastomosés entre eux et dont le contenu est osmiophile (fig. 4a—c), des vésicules «latérales» larges et claires, et des vésicules revêtues dispersées au hasard. Il n'est pas possible de déterminer, pour chaque dictyosome, une face de formation et une face de maturation. En effet d'une part l'ergastoplasme entoure presque complètement les saccules golgiens (fig. 4a), d'autre part le dictyosome n'élabore de volumineux grains de sécrétion sur aucune de ses faces. Les échanges entre le réticulum et les dictyosomes sont vraisemblablement réalisés au niveau des saccules les plus périphériques: le réticulum émet de petites évaginations à contenu assez opaque qui donnent naissance à des vésicules transitoires allant confluer dans l'appareil de Golgi (fig. 4b).

Le réticulum endoplasmique est abondant et toujours granulaire. Il est constitué de citernes tubulaires empilées pour la plupart parallèlement à l'axe cellulaire. Certaines se prolongent dans les microvillosités où elles pénètrent après avoir perdu leur revêtement de ribosomes (Fig. 7). L'ergastoplasme présente également d'autres aspects moins constants: saccules isolés, enroulement de citernes, figures myéliniques. Le contenu des citernes est clair ou présente un léger stroma opaque; il peut apparaître parfois, après fixation osmiée seule, sous forme d'une baguette très opaque (fig. 2). Au niveau de ces lamelles ergastoplasmiques se situent d'importantes variations morphologiques liées à l'état physiologique de la cellule. Les membranes des citernes ne sont pas nécessairement proches l'une de l'autre; l'espace interne qu'elles délimitent, généralement étroit (0,02 à 0,04 μ) peut s'élargir jusqu'à former de volumineuses cavités, claires ou contenant un stroma réticulé (fig. 3, 5 et 6). Lacuneux, l'ergastoplasme constitue alors un réseau très lâche qui parcourt toute la cellule, de la zone basale à la zone apicale; les mêmes variations s'observent d'ailleurs entre les membranes nucléaires.

Le cytoplasme contient aussi, mais de façon moins constante, des organites ovoïdes, pouvant atteindre 1,5 μ de diamètre et limités par une membrane agranulaire qui est parfois en continuité avec celle de l'ergastoplasme (fig. 5). Leur contenu présente souvent le même stroma réticulé qui apparaît parfois en couches concentriques peu opaques. La membrane peut être dédoublée et il en part de petits tubes radiaires (0,01 μ de diamètre) dont la cavité est claire et les parois revêtues extérieurement d'un matériel opaque. Ces sphérules, formés dans le réticulum endoplasmique, ont donc parfois une morphologie assez proche de celle des cristaux situés dans la lumière des tubes, mais ils sont moins volumineux et d'une structure plus uniforme.

Les microtubules sont dispersés et, surtout dans les cellules plus âgées, il y a quelques lysosomes et des corps multivésiculaires.

Les caractères cytologiques précédemment décrits ne présentent pas de modifications d'ensemble suffisamment nettes pour que diverses étapes d'un cycle cellulaire puissent être définies. En particulier, quelque soit l'état physiologique de la cellule, les invaginations basales de la membrane conservent la même taille et l'espace intercellulaire ne s'élargit jamais. Tout au plus peut-on noter que,

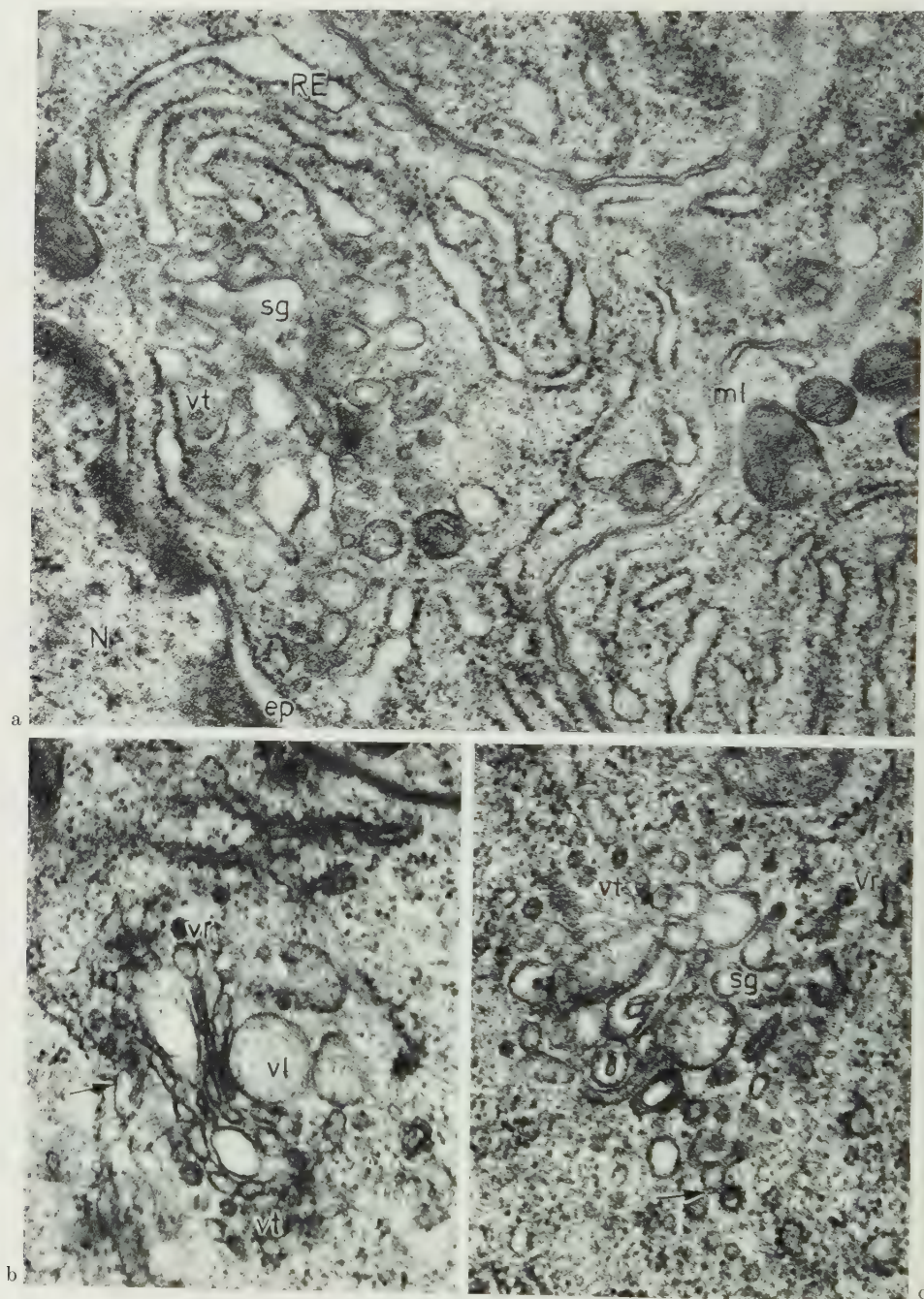


Fig. 4a - c. Appareil de Golgi. a ($\times 47\,600$). Les saccules golgiens *sg* sont presque complètement entourés par l'ergastoplasme *RE* dont les cavités sont élargies; il en est de même pour l'espace périnucléaire *ep*. b ($\times 46\,000$). Les vésicules transitoires *vt* sont nombreuses, certaines sont en cours de formation (flèche); les vésicules latérales *vl* ne sont jamais très larges. c ($\times 47\,600$). La formation des vésicules revêtues *vr* est particulièrement nette sur ce cliché (flèches)

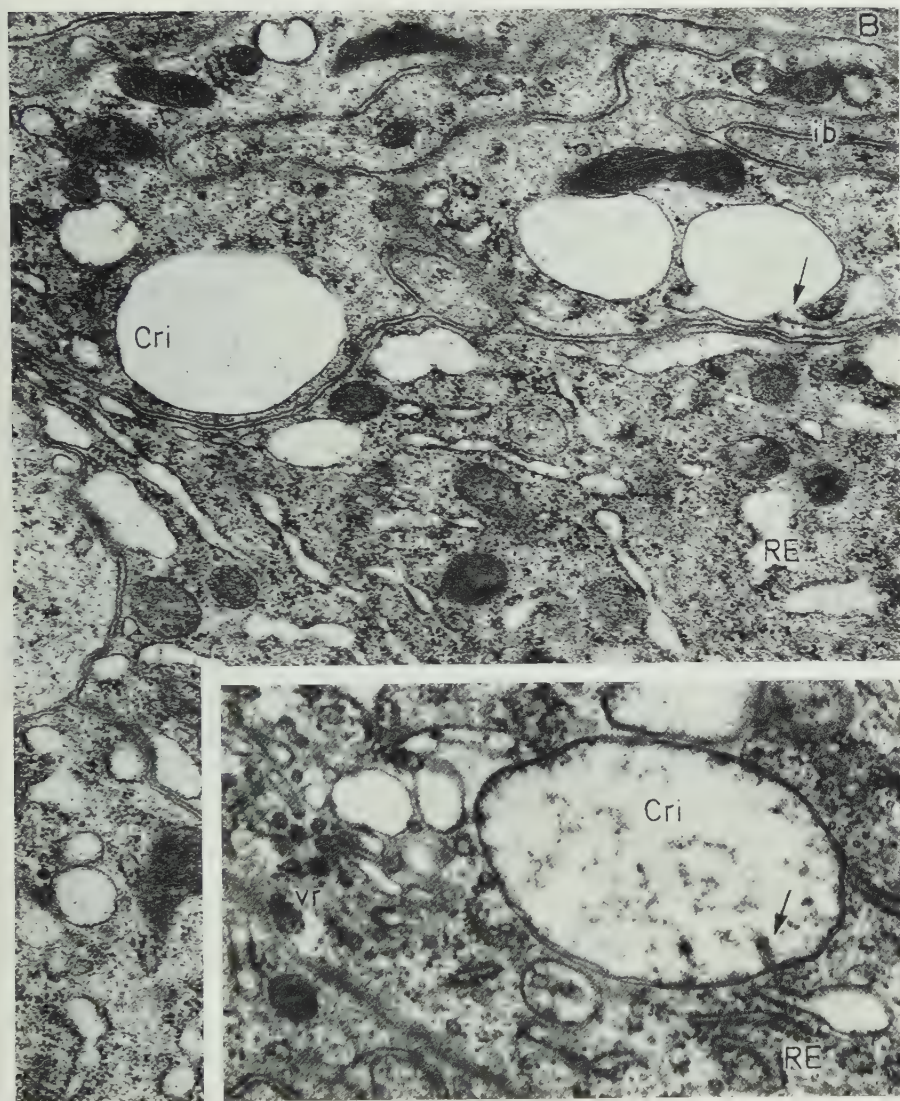


Fig. 5. Formation des sphérules intracytoplasmiques ($\times 22400$). Le reticulum endoplasmique s'écarte, et les ribosomes disparaissent au niveau de formation de ces sphérules (flèche). Dans la cellule voisine les citernes ergastoplasmiques sont élargies mais ne contiennent pas de cristaux en formation encart ($\times 38000$). Détail d'un cristal intracytoplasmique. Le stroma réticulé est visible ainsi que les petits tubules (flèche); notez l'abondance des vésicules revêtues *vr*

lorsque la cellule contient de gros cristaux, le réticulum endoplasmique présente des citernes étroites et que ribosomes libres et mitochondries sont moins nombreux, ce qui donne un aspect plus clair au cytoplasme malgré l'abondance des dictyosomes et des vésicules revêtues.

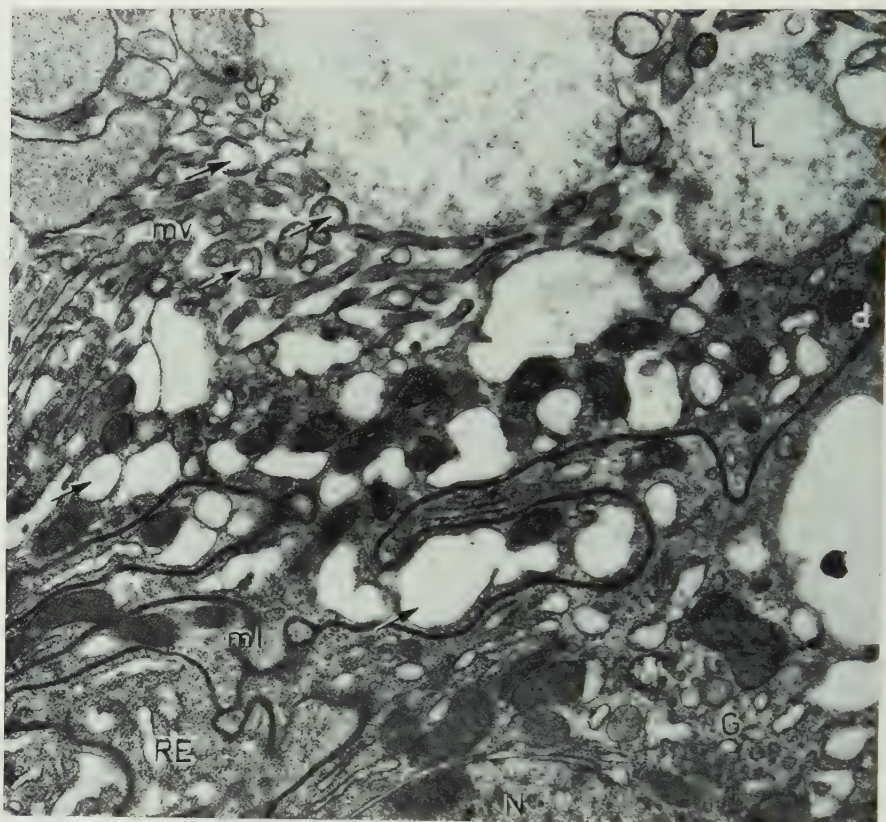


Fig. 6. Région apicale à microvillosités particulièrement nombreuses ($\times 17800$). Remarquez l'élargissement du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme et à l'intérieur des microvillosités (flèches)

2. Contenu de la lumière

La lumière renferme trois types de formation:

de très nombreuses particules de 100 Å environ, d'aspect granulo-fibreux (fig. 7, 8a et b, 9a).

des grains arrondis, de taille variable (0.03 à 1.2 μ de diamètre), et formés d'un matériel osmophile réparti de façon homogène (fig. 7, 8, 9a).

des sphérules de 1 à 7 μ de diamètre, limités par une membrane tripartite, ovoïdes ou de forme plus complexe résultant de la jonction de plusieurs cristaux primaires.

D'après leur ultrastructure, ces sphérules sont de 2 types. Le premier, le plus fréquent, est représenté par des cristaux clairs (fig. 8a): seul un stroma arachnoïde est visible et présente un centre qui peut être relié à une ou deux couches concentriques plus denses. Dans le second type, observé surtout chez les imago jeunes, des couches concentriques opaques, formées de très fines particules, alternent avec des couches claires identiques à celles du premier type cristallin (fig. 9a). Le nombre et l'épaisseur des couches sont très variables. Un aspect quelque peu



Fig. 7a et b. Détail de la région apicale. a ($\times 27400$). Le réticulum endoplasmique pénètre sous forme agranulaire dans les microvillosités *mv* (flèche). La lumière contient quelques grains de sécrétions *S* et de petites particules *p*. Notez chez cet imago très jeune la pauvreté relative du cytoplasme en organites. b ($\times 41400$). La pénétration du réticulum endoplasmique dans les microvillosités est ici moins nette, mais on note la présence de vésicules de pinocytose *vp*

différent n'a été observé qu'une fois: les cristaux pouvant atteindre 3μ , n'étaient pas limités par une membrane et les couches opaques étaient formées de très fines aiguilles ($0,3\mu$ de longueur) (fig. 9c). Il n'a pas été possible de déterminer s'il s'agissait d'un type particulier de cristal, avec une composition différente, ou si l'absence de membrane était due à un artefact de fixation.

Des cristaux de taille variable coexistent dans tout le tube. Toutefois ils sont fréquemment d'un diamètre plus réduit lorsqu'ils sont proches de la paroi.

Lorsque des cristaux, formés par la jonction de cristaux préexistants, présentent des couches concentriques alternativement claires et sombres, les couches centrales sont indépendantes, alors que les couches externes sont communes (fig. 9b).

L'étude histochimique avait révélé des sécrétions glycoprotéiques et des sphérocristaux biréfringents. Les grains osmiophiles correspondent aux sécrétions, les sphérules aux sphérocristaux.

II. Composition ionique des cristaux — Localisation du calcium

Les sphérocristaux précédemment étudiés sont eux-mêmes constitués d'un stroma glycoprotéique (mucopolysaccharides acides carboxylés, protides à groupements NH_2 , protides sulfhydrilés, notamment) qui retient du calcium et de

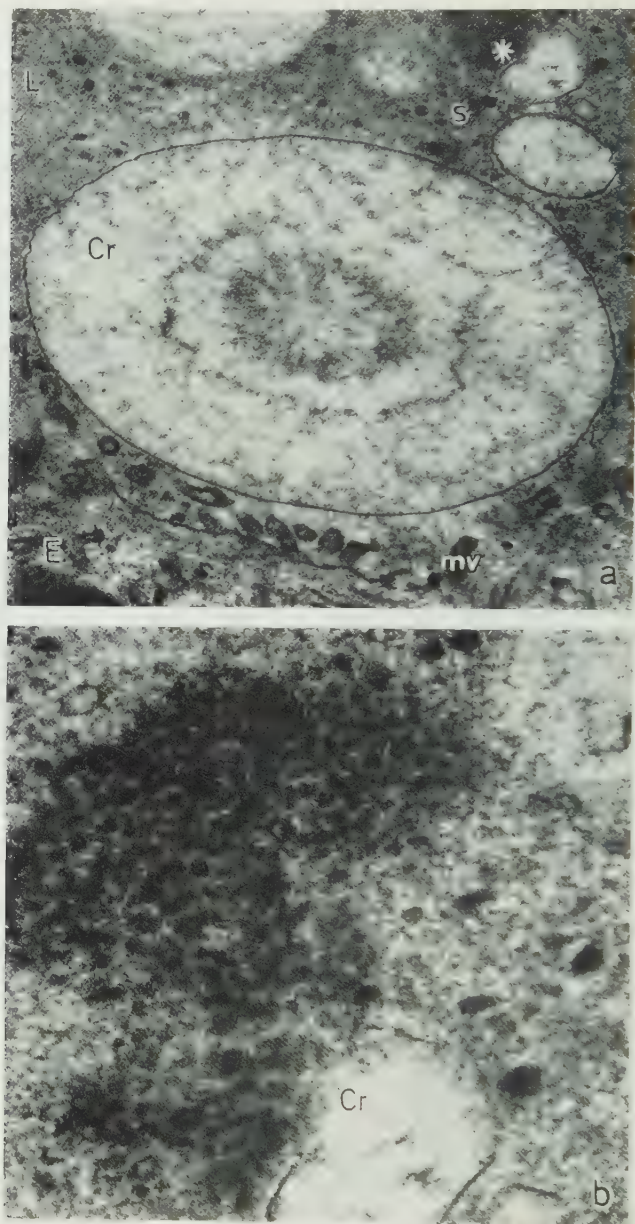


Fig. 8a et b. Région apicale et contenu de la lumière d'un imago âgé. a ($\times 22300$). Notez la présence d'une membrane plasmique entourant chaque cristal, l'absence de strates sombres, le stroma réticulé, la présence de grains de sécrétion. b ($\times 68000$). Détail de la région marquée d'un asterisque sur le cliché précédent: les petites particules semblent s'agglomérer pour constituer les grains de sécrétion

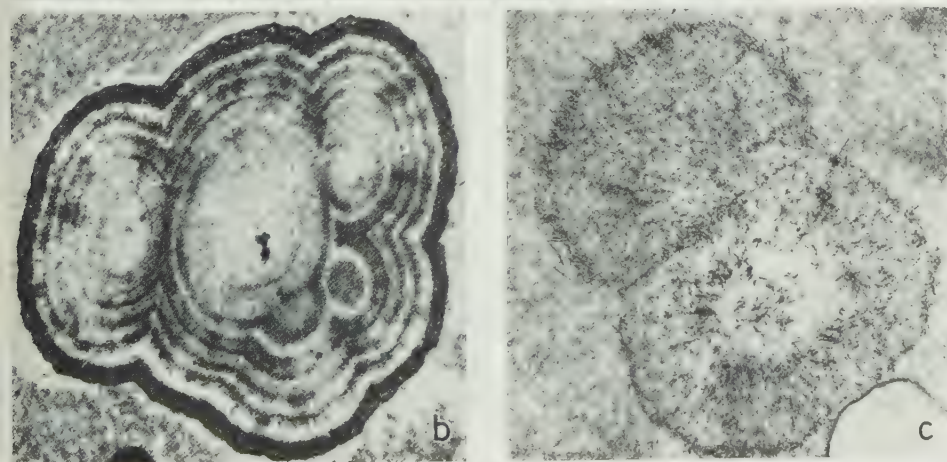
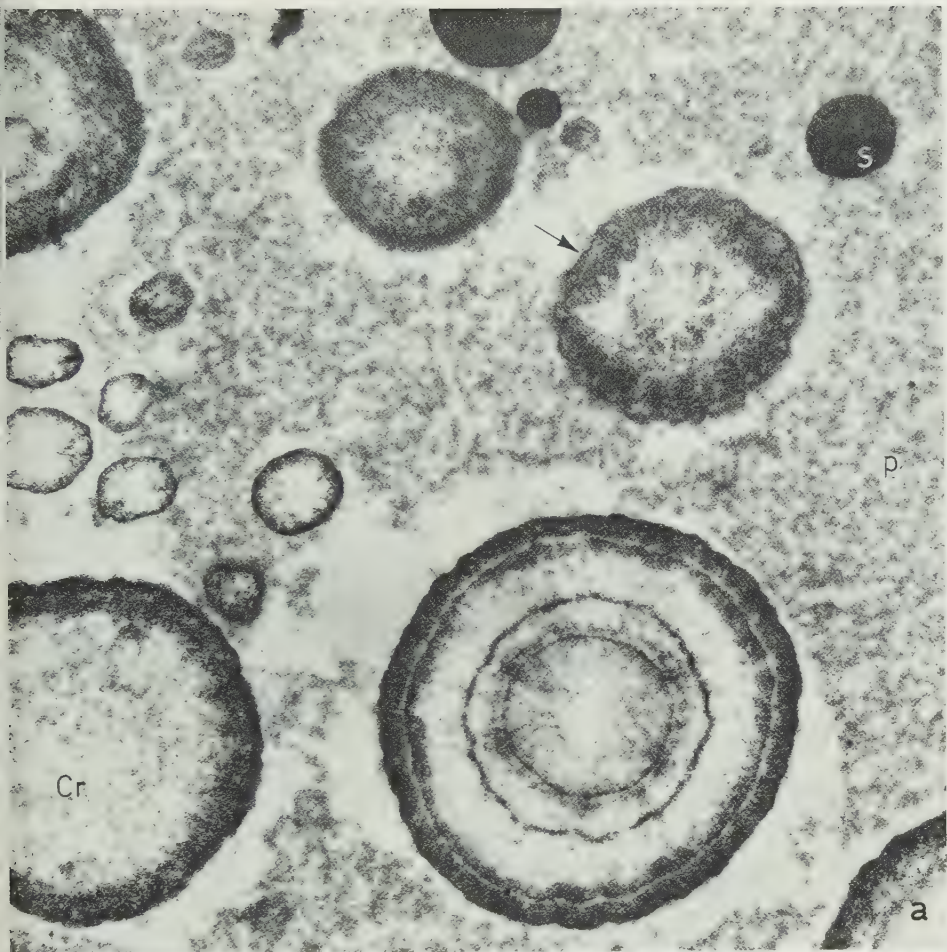


Fig. 9a—c. Contenu de la lumière d'imgo jeunes. a ($\times 16800$). Les cristaux, de taille variable, présentent des strates sombres, hétérogènes et qui, à la périphérie, se confondent fréquemment avec la membrane plasmique (flèche). Les petites particules sont nombreuses et les grains de sécrétion volumineux. b ($\times 22400$). Détail d'un cristal composite. c ($\times 10000$). Autre type de cristal observé très rarement: la membrane plasmique semble absente, les strates sombres sont constituées de fines aiguilles

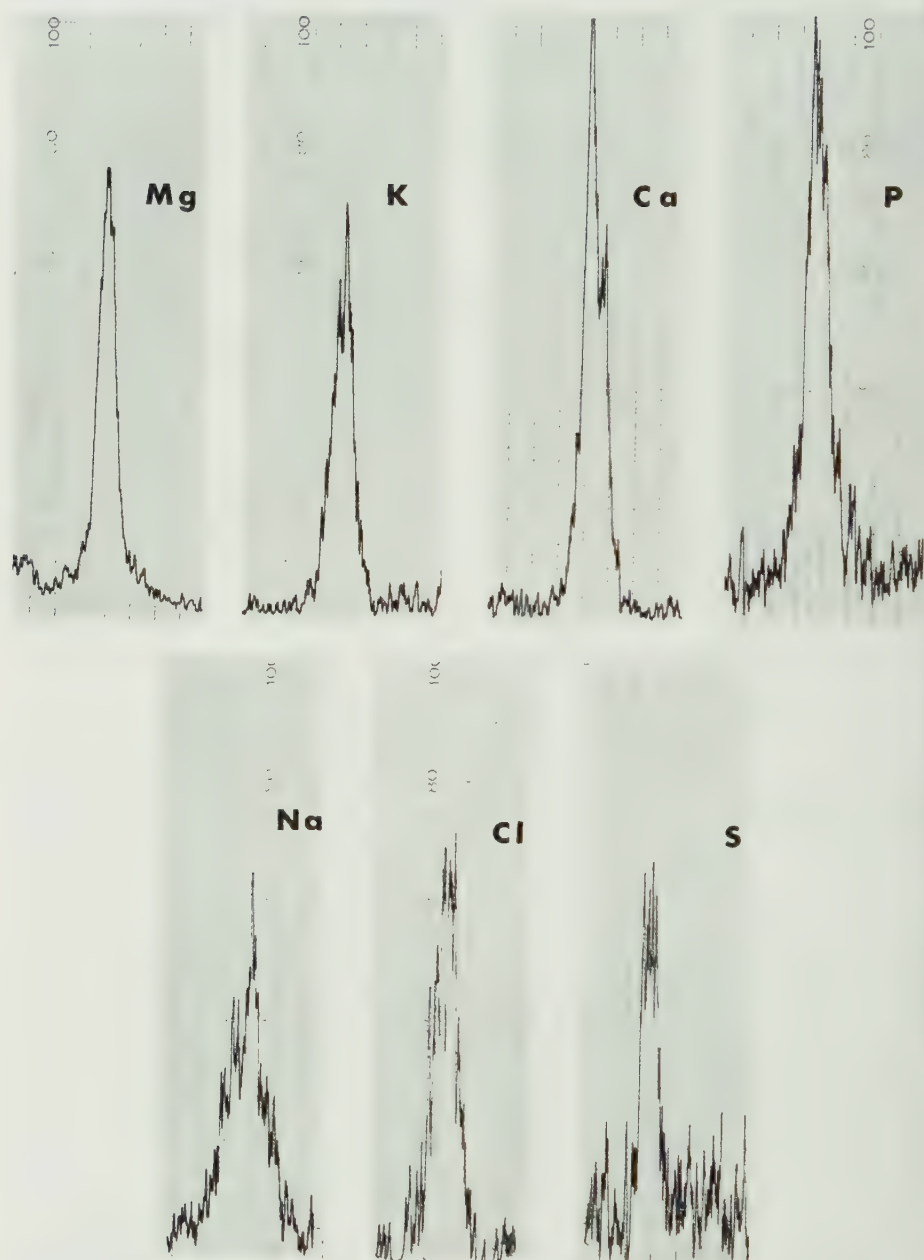


Fig. 10. Spectres obtenus par analyse aux rayons X à l'aide de la microsonde. Raies $K \alpha$

l'acide urique (Ballan-Dufrançais, 1968). L'analyse à la microsonde électronique² permet d'en préciser la nature ionique exacte: on trouve par ordre d'abondance décroissante: de l'azote, du magnésium, du calcaire et du phosphore, du potassium,

² Ces résultats ont été obtenus grâce à l'amabilité et la compétence de Monsieur le Professeur Galle et de Monsieur Berry que je remercie très vivement.

un peu de chlore et de sodium, du soufre et des traces de cuivre (fig. 10). Le carbone n'a pas été recherché par cette méthode, mais les carbonates n'ont pu être décelés par la technique proposée par Graff (1968) et appliquée, *in vitro*, au contenu des utricules.

Le problème de la répartition des ions dans les divers groupements chimiques sera envisagé plus loin. Il faut noter toutefois dès à présent l'abondance de l'ion magnésium qui n'avait pas été décelé par les méthodes cytochimiques.

Celles-ci, peu nombreuses en ce qui concerne la localisation ultrastructurale, ont été appliquées à la recherche du calcium. Ce cation est révélé au niveau des strates sombres des cristaux. Dans la paroi des utricules, des recherches préliminaires permettent d'envisager une localisation dans la gaine conjonctive, où il forme des dépôts clairsemés n'ayant aucun rapport avec des structures particulières; au niveau des cellules épithéliales il se trouve plus précisément dans les invaginations basales de la membrane, ainsi que dans les cavités du réticulum endoplasmique.

III. Excrétion d'acide urique par les utricules

Afin d'étudier la cinétique et le mode d'excrétion des urates par les utricules, un isotope radioactif, l'acide urique- ^{14}C a été utilisé comme traceur. Après injection dans l'hémolymph il a été recherché, à des temps déterminés, dans la phase soluble et dans la phase cristalline du contenu des utricules, ainsi que dans les tubes de Malpighi et dans les excréta. L'acide urique- ^{14}C disparaît progressivement de l'hémolymph et apparaît dans la phase soluble des utricules dans les 15 mn qui suivent l'injection; il y est décelable tant que l'hémolymph reste radioactive. Les sphérocristaux sont marqués 3 heures après l'injection et le demeurent. Quant aux tubes de Malpighi ils ne deviennent jamais radioactifs alors que les excréta recueillis dans les heures qui suivent l'injection émettent une forte radioactivité.

Discussion

La présence de sécrétions glycoprotéiques et de cristaux riches en urates dans la lumière des utricules, permettait de rechercher certaines analogies entre ces glandes annexes d'un appareil génital et les tubes de Malpighi dans le cas notamment ou ces derniers possèdent un segment muqueux et éliminent des déchets puriques (Gagnepain, 1956; Pesson, 1956; Berkaloﬀ, 1961; Martoja, 1961; Gouranton, 1968). Il s'est avéré que le mécanisme d'excrétion est identique dans les deux types d'organes, mais que les deux fonctions (excrétion et sécrétion) sont conjointement assumées par un type cellulaire unique présent tout au long du tube. La discussion portera tout d'abord sur les aspects ultrastructuraux paraissant en rapport avec ces deux fonctions.

En ce qui concerne la fonction sécrétrice, la lumière des utricules contient, comme celle des tubes de Malpighi des Orthoptères ou des Odonates, des sécrétions glycoprotéiques. Mais les cellules des utricules diffèrent des mucocytes par l'absence de phase de stockage des composés élaborés. De ce fait les aspects ultrastructuraux à envisager ne peuvent évidemment concerner que la phase d'élaboration des glycoprotéines. La présence de lamelles ergastoplasmiques entourant de nombreux dictyosomes, la vésiculation de ces lamelles, la pénétration dans les sacs golgiens des vésicules transitoires ainsi formées sont caractéristiques de

cette fonction (Ovtracht, 1967). Il en est vraisemblablement de même en ce qui concerne l'anastomose des saccules golgiens décrite dans certaines cellules à grande activité de synthèse (oocyte d'*Ophioderma panamensis*, Kessel, 1965, 1968). Peu après la mue imaginale d'ailleurs, au moment où les cellules entament leur cycle sécrétoire, les polysomes et ribosomes sont plus nombreux, les nucléoles et les dictyosomes plus développés qu'à des stades ultérieurs. Le mécanisme d'extrusion des sécrétions n'a pu être déterminé avec certitude. La membrane apicale forme des invaginations qui peuvent aussi bien représenter des vésicules de pinocytose que résulter de l'éclatement des vésicules golgiennes (Friend et Farquhar, 1967). Quoiqu'il en soit, la cellule expulse de très petites particules qui par leur agglomération doivent constituer les grains de sécrétion.

Par d'autres caractères la paroi des utricules se rapproche des épithélium excréteurs classiques. Ces caractères concernent surtout la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. La structure de la basale ne peut être prise en considération puisque dans les tubes de Malpighi, elle semble varier d'une espèce à l'autre (Berkaloff, 1961; Tsubo et Brandt, 1962).

La région basale de la membrane plasmique présente de nombreuses invaginations; celles-ci restent de taille constante et ne délimitent jamais d'espace intercellulaire élargi comme c'est fréquemment le cas dans les épithélium qui sont le siège d'un transit et en particulier celui des tubes de Malpighi de *Calliphora* (Berridge-Oschman, 1969). La présence d'invaginations et de nombreuses mitochondries dans cette zone permet toutefois de penser qu'elle est le siège d'un transport actif.

Les microvillosités sont simples, disposées irrégulièrement, moins nombreuses et beaucoup moins longues que dans la plupart des tubes de Malpighi. Elles sont dépourvues de mitochondries; ces organites peuvent d'ailleurs, selon les espèces, exister ou au contraire manquer dans les microvillosités des cellules malpighiennes. (Bradfield, 1953; Beams et al., 1955; Meyer, 1957; Berkaloff, 1961; Smith et Littau, 1960; Tsubo et Brandt, 1962; Wigglesworth et Salpeter, 1962; Baccetti, Mazzi et Massimello, 1963; Füller, 1966; Dressler, 1968; Wessing, 1968; Berridge et Oschman, 1969). Leur membrane est recouverte extérieurement d'un feutrage; leur hyaloplasme contient des filaments axiaux, décrits également dans les tubes de Malpighi de *Calliphora* (Berridge et Oschman, 1969).

Quant au réticulum endoplasmique, il contient des cristaux et semble constituer une voie de passage entre l'hémolymphe et la lumière.

Les saccules ergastoplasmiques en effet s'écartent parfois, perdent leur revêtement de ribosomes et contiennent alors des concrétions sphéroïdes. André et Fauré-Fremiet (1967) avaient pressenti le rôle du réticulum endoplasmique dans la formation des lithosomes de *Prorodon Morgani*; Gouranton (1968) envisage un rôle identique pour la formation des concrétions de l'intestin moyen des *Cercopides*. Les vacuoles à concrétion des tubes de Malpighi du Grillon pourraient également avoir cette origine.

Par ailleurs dans les cellules des utricules le réticulum endoplasmique d'une part est accolé aux invaginations basales et d'autre part pénètre sous forme agranulaire dans les microvillosités. Dans les tubes de Malpighi, plusieurs auteurs ont décrit des aspects assez comparables: Wessing (1968, *Drosophila*) observe un

réticulum endoplasmique agranulaire dans les microvillosités et un ergastoplasme bien développé qui de surcroît est en continuité avec les invaginations basales de la membrane plasmique. Wigglesworth (1962, *Rhodnius*), Baccetti et coll. (1963, *Dacus oleae*) décrivent un réticulum endoplasmique abondant et qui se prolonge dans les microvillosités. Les «membranes flexueuses» et le «canalicule axial» des microvillosités observées par Berkaloﬀ (1961) chez le Grillon pourraient également avoir pour origine le réticulum endoplasmique.

On peut donc penser que dans les utricules, comme dans les tubes de Malpighi de plusieurs espèces d'Insectes, le réticulum endoplasmique constitue le principal organite d'élimination de substances dissoutes ou cristallisées.

L'hypothèse d'une cristallisation dans la lumière a déjà été envisagée par Berkaloﬀ (1961), Waterhouse (1950) et Wigglesworth (1931 à 1965). Dans le cas des utricules de *Blatella* plusieurs données morphologiques ou expérimentales viennent à l'appui de cette hypothèse. Seule la lumière contient de gros cristaux complexes, formés par la jonction de sphérules plus petits. Les couches externes sont communes et se sont donc déposées postérieurement à la jonction. De plus les cristaux situés à proximité de la paroi sont plus petits que ceux situés au centre de la lumière. Enfin l'acide urique-14C injecté dans l'hémolymphe, est décelable dans la phase soluble avant de l'être dans la phase cristallisée, ce qui implique un passage en solution jusqu'à la lumière suivi d'une cristallisation dans les sphérules. Ce mécanisme paraît ainsi identique à celui qui a été envisagé par Wigglesworth (1962) dans les tubes de Malpighi de *Rhodnius*.

Il semble donc bien que des substances provenant de l'hémolymphe traversent les invaginations basales, puis pénètrent dans les saccules ergastoplasmiques. Certaines y cristallisent alors que d'autres cheminent dans les cavités du réticulum endoplasmique jusqu'à l'apex des microvillosités, pour cristalliser dans la lumière.

Il n'a pas été possible de déterminer si ces deux mécanismes sont successifs ou simultanés: toutefois lorsqu'une cellule contient des cristaux intracytoplasmiques, elle présente un cytoplasme moins riche en organites et des cavités ergastoplasmiques étroites. De plus, quelque soit l'âge de l'animal, le nombre des cristaux intracytoplasmiques est toujours infiniment plus faible que celui des cristaux de la lumière.

Le mécanisme d'extrusion des cristaux intracytoplasmiques n'a pu être élucidé. Ils pourraient soit sortir par les microvillosités comme chez le grillon (Berkaloﬀ, 1961) soit s'isoler dans le hyaloplasme et rompre ensuite la membrane plasmique apicale. Aucun cristal n'a été observé dans les microvillosités qui semblent d'ailleurs trop étroites et trop courtes pour permettre le passage des concrétions. Par contre la membrane plasmique apparaît parfois rompue à proximité des sphérules: un tel aspect cytotologique pourrait toutefois être interprété comme un artefact. Il est donc difficile de conclure, d'autant que rien ne permet de rejeter l'hypothèse d'une remise en solution des substances constituant les cristaux intracytoplasmiques.

Par de nombreux caractères morphologiques et physiologiques les utricules se rapprochent donc des tubes de Malpighi; ils diffèrent par contre des cellules à urates du corps gras qui synthétisent leurs produits d'accumulation à partir de précurseurs puriques (McEnroe et Forgash, 1957, 1958). Il paraissait nécessaire de situer la place occupée par ce système excréteur original dans la physiologie de

l'Insecte: il semblerait, d'après les données de Razet (1966), que les utricules doivent représenter la seule voie d'élimination des déchets puriques par l'organisme. De fait, aucune élimination d'acide urique- ^{14}C par les tubes de Malpighi n'a été constatée au cours de ces recherches. Mais grâce à sa très grande sensibilité, cette méthode démontre l'existence d'une autre voie d'excrétion par la paroi du tube digestif.

L'utilisation de traceurs permet également d'aborder la cinétique de l'excrétion. Dans la mesure où ce problème n'a pas encore été envisagé à propos d'autres organes excréteurs d'Insectes, tout au moins *in vivo*, il est difficile d'apprécier la vitesse de diffusion à travers la paroi des utricules: elle semble toutefois relativement rapide.

En ce qui concerne les cristaux, certains aspects ultrastructuraux et l'utilisation d'une méthode précise d'analyse ionique ont permis d'apporter quelques données originales.

Ces cristaux sont constitués de couches concentriques cristallines maintenues dans un stroma glycoprotéique. Leur morphologie rappelle celle de sphérules fréquemment décrites dans divers organes: concrétions intestinales de Cercopides (Gouranton, 1968), cristaux de l'iléon de *Ailopus strepens* (Baccetti, 1960), lithiases rénales de l'Homme ou du Rat (Galle, 1965), sphérocristaux de nombreux tubes de Malpighi: *Acheta* (Berkaloff, 1961), *Rhodnius* (Wigglesworth et Salpeter, 1962), *Calliphora* (Gupta et Berridge, 1968), *Dacus oleae* (Baccetti et coll., 1963), larve de *Lucilia* (Waterhouse, 1950). Chez *Blatella* les cristaux sont toujours entourés par une membrane plasmique qui est sans doute d'origine ergastoplasmique, qui s'accroît en même temps que le cristal qu'elle renferme et qui pourrait jouer un rôle dans la cristallisation des substances qui la traversent. Les petits tubules qui contiennent les cristaux intracytoplasmiques pourraient quant à eux provenir de vésicules revêtues qui seraient alors à l'origine du stroma organique.

Les méthodes cytochimiques traditionnelles ont permis de déceler dans les cristaux de l'acide urique et du calcium. Ce dernier composé n'est toutefois révélé que par des méthodes de substitution, une interférence avec d'autres cations est donc possible et la nature des anions associés ne peut être précisée. De surcroît, ces méthodes ne sont pas applicables à certains ions, elles peuvent donner des résultats «faussement positifs» ou entraîner une solubilisation partielle. C'est pourquoi l'analyse ponctuelle par spectrographie des rayons X a été appliquée à des coupes et à des frottis: cette méthode, semi quantitative, permet de déterminer sans artefact possible tous les ions des cristaux, toutefois elle ne fournit aucune indication sur les liaisons entre les divers ions décelés. Les résultats conduisent à formuler certaines hypothèses: les urates pourraient être liés au magnésium et au potassium, le phosphore et le calcium présents sous forme de phosphates de Ca; le soufre, quant à lui, doit entrer dans la composition des protéines sulphydrilées. Si l'on s'en tient à la composition ionique, les cristaux des utricules apparaissent qualitativement plus riches que ceux qui ont été décrits jusqu'alors dans divers organes ayant une fonction d'excrétion ou d'accumulation (voir tableau). De même, les produits d'excrétion non cristallins de certains tubes de Malpighi ont une composition moins variée. Si l'on excepte le cas du baryum et du strontium, on peut constater que les cristaux des utricules contiennent l'ensemble des ions qui ont été décelés auparavant de façon partielle dans les autres organes. Il est

Tableau

Organe	Uricules	Corps gras	Tubes de Malpighi	Tubes de Malpighi	Tubes de Malpighi	Tubes de Malpighi	Intestin moyen	Rein après traitements expérimentaux
Animal	<i>Blatella</i>	<i>Blatella</i>	<i>Dirippus</i>	<i>Rhodnius</i>	<i>Lucilia</i> (larve)	<i>Acheta</i>	<i>Malacosoma</i>	<i>Homo, Rattus</i>
Composition ionique								
N	+	+	+	+	+	+	-	
Mg	+	+	+	+	+	+	+	
K	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca	+	traces	+	+	+	+	+	+
P	+	+	+	+	+	+	+	
carbonates	-				(phosphates)	(phosphates)	(phosphates)	
oxalates					(carbonates)		(carbonates)	
Na	+	-	+	+	-			
Cl	+	-	+	+	+			
S	+				(traces)			
Cu	+				(chlorates)			
Ba	0	-			(sulfates)			
Sr	0				+		+	
Fe	0				+		+	
Al	0				+		+	
Localisation des ions	cristaux	cristaux	urine	cristaux et urine proximale	cristaux	cristaux	cristaux	cristaux
Techniques employées	Cytochimie Spectrographie X		Chimie	Cytochimie	Chimie Cytochimie	Cytochimie	Cytochimie	Spectrographie X
Auteur	Ballan-Dufrançais (1970)		Ramsay (1956)	Wigglesworth (1931)	Waterhouse (1950)	Berkaloff (1961)	Gouranton (1968)	Galle (1965)

encore impossible d'affirmer que la composition des cristaux étudiés dans d'autres organes est plus simple que celle des cristaux des utricules, puisque les résultats antérieurs s'appuient sur les seules techniques chimiques ou cytochimiques. Toutefois l'analyse ponctuelle du corps gras et des utricules révèle des différences importantes puisque les cristaux du corps gras sont notamment dépourvus de magnésium et très pauvres en calcium.

En conclusion, les utricules constituent un organe assez original, puisque leur développement est lié à la différenciation imaginale de l'appareil génital mâle alors que leur morphologie et leur physiologie sont celles d'un appareil excréteur. Les caractères morphologiques et physiologiques les plus apparents permettent de placer ces organes sur le même plan que les tubes de Malpighi. Des travaux en cours devraient permettre de rechercher la part des mécanismes de transport actif intervenant entre les utricules et l'hémolymphe.

Abréviations utilisées dans les figures: *GC* gaine conjonctivomusculaire; *cf* couche fibreuse; *fm* fibres musculaires; *H* haemocyte; *B* basale anhyte; *E* épithélium; *ib* invaginations basales de la membrane plasmique; *ml* région latérale de la membrane plasmique; *mv* microvillosités; *d* desmosome; *N* noyau; *RE* reticulum endoplasmique; *G* appareil de Golgi; *sg* saccules golgiens; *vl* vésicules «latérales»; *vr* vésicules revêtues; *vt* vésicules transitoires; *M* mitochondrie; *m* microtubule; *Cr i* sphérule intracytoplasmique; *L* lumière; *Cr* sphérocrystal; *S* grain de sécrétion; *P* petites particules. — Toutes les photos proviennent de pièces fixées au glutaraldéhyde-osmium, à l'exception du matériel du cliché No 2 fixé à l'osmium seul.

Bibliographie

- André, J., Fauré-Fremiet, E.: Formation et structure des concrétions calcaires chez *Prorodon morgani* Kahl. *J. Microscopie* **6**, 391—398 (1967).
- Baccetti, B.: Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti. I/L'ileo di un Ortoterro adulto. *Redia* **45**, 263—278 (1960).
- Mazzi, V., Massimello, G.: Ricerche istochimiche e al microscopio elettronico sui tubi Malpighiani di *Dacus oleae* Gmel. I/La larva. *Z. Zellforsch.* **59**, 47—70. II/L'adulto. *Redia* **48**, 47—68 (1963).
- Ballan-Dufrançais, C.: Données morphologiques et histologiques sur les glandes annexes mâles et le spermatophore de *Blatella germanica*, au cours de la vie imaginale. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **93**, No 3, 401—423 (1968).
- Beams, H. W., Tahmisian, T. N., Devine, R. L.: Electron microscopic studies on the cell of the Malpighian tubules of the Grasshopper (*Orthoptera-Acrididae*). *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 197—202 (1955).
- Berkaloff, A.: Contribution à l'étude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les insectes. Thèse. *Ann. Sci. Nat. (Zool.)* XII. sér. 869—947 (1961).
- Berridge, H. J., Oschman, J. L.: A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. *Tissue and Cell.* **1**, 247—272 (1969).
- Bradfield, J. R. Q.: New features of protoplasmic structure observed in recent electron microscope studies. *Quart. J. micr. Sci.* **94**, 351—367 (1953).
- Carasso, N., Favard, P.: Mise en évidence du calcium dans les myonèmes pédoneculaires de Ciliés Peritriches. *J. Microscopie* **5**, 759—770 (1966).
- Dressler, M.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Malpighischen Gefäße von *Galerucella viburni* (Chrysomelidae). *Z. Wissensch. Zool. A. Dtsch.* **178**, No 1—2, 40—71 (1968).
- Fauré-Fremiet, E., André, J., Ganier, M. C.: Calcification tégumentaire chez les Ciliés du genre *Coleps* Nitzsch. *J. Microscopie* **7**, 693—704 (1968).
- Friend, D. S., Farquhar, M. G.: Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J. Cell. Biol.* **35**, No 2, 357—376 (1967).
- Füller, M.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Malpighischen Gefäße von *Lithobius forficatus*. *Z. wiss. Zool.* **173**, 191—217 (1966).

- Gagnepain, J.: Cytochimie et histochimie des tubes de Malpighi des Odonates. Bull. Soc. Zool. Fr. **81**, 395—410 (1956).
- Galle, P.: Analyse chimique ponctuelle des inclusions intracellulaires par spectrographie des rayons X. Application à l'étude des cellules rénales. Thèse. Paris: L'Expansion, 1—42 (1965).
- Gouranton, J.: Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des Homoptères Cercopides. J. Cell. Biol., **37**, 316—328 (1968).
- Sécration d'un mucus complexe par les tubes de Malpighi des larves de Cercopides (Homoptera). Rôle dans la formation de l'abrispumeux. Ann. Sci. Nat. (Zool.) **10**, 117—126 (1968).
- Graff, F.: Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodes *Orchestia* (Talitridé) et *Niphargus* (Gammaridé hypogé). Thèse. Fac. Sciences Dijon. 216 p. (1968).
- Gupta, B. L., Berridge, M. J., in Smith, D. H.: Insect cell, p. 292—297. Edinbourg: Oliver and Boyd 1968.
- Kessel, R. G.: An electron microscope study of differentiation and growth in oocytes of *Ophioderma panamensis*. J. Ultrastruct. Res. **22**, 63—89 (1968).
- Beams, H. W.: An unusual configuration of the Golgi complex in pigment-producing "test" cells of the ovary of the tunicate *Stycta*. J. Cell. Biol. **25**, 55—67 (1965).
- MacEnroe, W., Forgash, A.: The *in vivo* incorporation of C14 Formiate in the ureide groups of uric acid by *Periplaneta americana* L. Ann. ent. Soc. Amer. **50**, 429—431 (1957).
- Forgash, A.: Formiate metabolism in the american cockroach *Periplaneta americana* L. Ann. ent. Soc. Amer. **51**, 126—129 (1958).
- Martoja, R.: Caractéristiques histologiques du segment muqueux de l'appareil excréteur des Orthoptères. C. R. Acad. Sci. (Paris) **253**, 3063—3065 (1961).
- Meyer, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Malpighi-Gefäßen verschiedener Insekten. Z. Zellforsch. **47**, 18—28 (1957).
- Ovtracht, L.: Ultrastructure des cellules sécrétrices de la glande multifide de l'Escargot. J. Microscopie **6**, 773—790 (1967).
- Pesson, P.: Sécration d'une mucoprotéine par les tubes de Malpighi de larves de Cercopides. Son rôle dans la formation de l'abrispumeux. Boll. Lab. Zool. Portici (Napoli) **33**, 341—349 (1956).
- Ramsay, J. A.: Excretion by the malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera-Phasmidae): calcium, magnesium, chlorate, phosphate and hydrogen ions. J. exp. Biol. **33**, 4, 697—708 (1956).
- Razet, P.: Recherches sur l'uricolyse chez les insectes. Thèse. Ann. Biol. **6**, 43—73 (1966).
- Smith, D. S., Littau, V. C.: Cellular specialization in the excretory epithelia of an insect, *Macrosteles fascifrons* Stahl (Homoptera). J. biophys. biochem. Cytol. **8**, 103—133 (1960).
- Takamashi, S. Y., Suzuki, G., Ohnishi, E.: Origin of oxalic acid in Ca oxalate crystals in the Malpighian tubules of the tent caterpillar *Malacosoma neustria testacea*. J. Insect. Physiol. **15**, 403—407 (1969).
- Tsubo, I., Brandt, P. W.: An electron microscopic study of the Malpighian tubules of the grasshopper *Dissosteira carolina*. J. Ultrastruct. Res. **6**, 28—35 (1962).
- Waterhouse, D. F.: Studies of the physiology and toxicology of blowflies XIV. The composition, formation, and fate of the granules in the Malpighian tubules of *Lucilia cuprina* larvae. Aust. J. Sc. Res., Ser. B **3**, 76—112 (1950).
- Wessing, A.: Funktionsmorphologie von Exkretionsorganen bei Insekten. Zool. Anz., Suppl. Dtsch. **31**, 633—681 (1968).
- Wigglesworth, V. B.: The physiology of excretion in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera Reduviidae). J. exp. Biol. **8**, 411—451 (1931).
- Wigglesworth, V. B.: The principles of insect physiology, 6th ed. London: Methuan & Cie. 1965.
- Salpeter, M. M.: Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera). J. Insect. Physiol. **8**, 299—307 (1962).

Christiane Ballan-Dufrançais
Faculté des Sciences de Paris
Laboratoire de Biologie Animale C
12, rue Cuvier
F-75 Paris V^e

Ultrastructure de l'iléon de *Blatella germanica* L. (Dictyoptère)

Localisation, genèse et composition des concrétions minérales
intracytoplasmiques

Christiane Ballan-Dufrançais *

Laboratoire d'Histophysiologie des Insectes; Université Paris VI, Paris
Laboratoire de Microscopie Électronique appliquée à la Biologie, Paris

Reçu le 19 mai 1972

Ultrastructure of the Ileum in *Blatella germanica* L. (Dictyoptera)

Localisation, Origin and Composition of Intracellular Mineralized Concretions

Summary. The ileum of *Blatella germanica* is an important proctodeal segment of mineral accumulation. The numerous concretions, elaborated by the ergastoplasm, contain P, Cl, Ca, Mg, K and Fe in a glycoproteic matrix. The epithelium of this segment is composed by only one type of cells which are characterized by apical leaflets and basal infoldings. These membranous differentiations have been already described in other transit organs, but their coexistence is typical of the ileum. The physiological significance of this digestive segment is discussed.

Key words: Excretory organ — Ileum — *Blatella germanica* — Ultrastructure — Microprobe analysis.

Résumé. L'iléon de *Blatella germanica* est un important segment d'accumulation minérale. Les nombreuses concrétions d'origine ergastoplasmique, contiennent du phosphore, du chlore, du calcium, du magnésium, du potassium et du fer dans un stroma glycoprotéique. La paroi de ce segment proctodéal est constituée d'un type cellulaire unique caractérisé par la présence de feuillets apicaux et d'invaginations basales, différenciations membranaires décrites dans d'autres organes de transit, mais dont la coexistence constitue l'originalité de l'iléon. La signification physiologique de ce segment digestif est discutée.

Introduction

Le rectum des insectes a été étudié à l'échelle ultrastructurale dans plusieurs ordres: Diptères (*Aedes*, Hopkins, 1967; *Calliphora*, Gupta et Berridge, 1967), Coléoptères (*Troglodorus*, Strambi et Zylberberg, 1967), Isoptères (*Cephalothermes*, Noirot, 1967), Dictyoptères (*Periplaneta*, Oschman et Wall, 1969). Par contre, les données récentes sur l'iléon ne concernent que deux Orthoptères (*Ailoppus*, Baccetti, 1960; *Locusta*, Aubry, 1971) un Hétéroptère (*Cenocorixa*, Jarial et Scudder, 1970), et un Thysanoure (*Lepismodes*, Noirot et Noirot-Thimothee, 1971).

Le fait que des inclusions puriques ou minérales aient été signalées dans ce segment proctodéal chez *Ailoppus* (Baccetti, 1960) et qu'elles aient été observées également dans l'iléon de *Blatella* (Ballan-Dufrançais, 1968) et de *Locusta* (Ballan-Dufrançais et Martoja, 1971) suggère que ce segment digestif pourrait avoir un

* Avec la collaboration technique de Melle M. Oricco. Recherches effectuées dans le cadre de la RCP no 162 du C.N.R.S.

rôle d'accumulation. Il s'avérerait donc indispensable de préciser les caractères morphologiques de la paroi et la nature des inclusions de l'iléon de *Blatella germanica* L. Cette étude a été réalisée par l'application de méthodes ultrastructurales et cytochimiques combinées à l'analyse ionique par spectrographie des rayons X.

Matériel et techniques

L'iléon de *Blatella germanica* a été prélevé sur des adultes des deux sexes qui vivent en commensaux d'autres élevages du laboratoire.

Les pièces destinées à la microscopie photonique ont été fixées au liquide de Carnoy, puis incluses à la paraffine et coupées à 7 μ . Pour la mise en évidence des composés organiques les méthodes suivantes ont été utilisées: réaction à l'acide periodique-Schiff, coloration au bleu alcian à pH 3 et 0,5 et réaction métachromatique à pH 4,5 pour les mucopolysaccharides acides; réaction à l'alloxane-Schiff, tétrazoréaction de Danielli-Burstone pour la mise en évidence des protéines. Ces réactions ont été conduites selon les indications fournies par le manuel de R. et M. Martoja (1967). Pour la mise en évidence des éléments minéraux et des déchets puriques les techniques utilisées sont celles employées et discutées dans un précédent travail (Ballan-Dufrançais et Martoja, 1971).

L'analyse ionique par spectrographie des rayons X a été réalisée dans des conditions techniques déjà décrites (Ballan-Dufrançais et Martoja, 1971). Les éléments suivants ont été recherchés: Ba, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn.

Les pièces destinées à la microscopie électronique ont été fixées par le glutaraldéhyde ou par le mélange paraformaldéhyde-glutaraldéhyde (Karnowsky, 1965) tamponnés au cacodylate de sodium (pH 7,4), post-fixées à l'acide osmique à 2% dans le tampon Palade, puis incluses dans l'épon-araldite. Le contraste des coupes a été renforcé à l'uranyle-plomb. En ce qui concerne la mise en évidence ultrastructurale des substances minérales, les méthodes à l'acétate de plomb et au nitrate de cobalt (Carasso et Favard, 1966) ont été employées pour la recherche des anions, la méthode au pyroantimonate de potassium (Komnick, 1962 modifiée par Nolte, 1966) pour la recherche des cations. Cette méthode, utilisée par Nolte pour la recherche du sodium, met aussi en évidence le potassium (Torack et La Valle, 1970) le calcium et le magnésium (Bulger, 1969).

Observations

L'iléon constitue le plus volumineux segment du proctodeum. Situé sous la valvule proctodéale il est formé d'une poche antérieure élargie (fig. 1), prolongée par une partie tubulaire allongée, peu différenciée extérieurement d'un très court colon.

1. Caractères cytologiques de la paroi

L'épithélium, simple, repose sur une lame basale (fig. 4a) d'épaisseur variable (0,1 à 0,8 μ), qui pénètre par endroits entre les cellules épithéliales et forme des replis assez larges et profonds. Cette lame basale est constituée de couches granulo-fibreuses qui emprisonnent quelques inclusions sphériques (0,2 à 0,5 μ), opaques aux électrons et ne paraissant pas limitées par une membrane.

Les cellules épithéliales de la poche antérieure sont étroites (12 μ) et de hauteur variable: des massifs de cellules hautes (70 μ) sont séparés les uns des autres par quelques cellules plus plates (16 μ) et l'épithélium présente de ce fait un aspect vilieux (fig. 1). Dans le tube postérieur, les cellules ont toutes la même hauteur (50 μ). Les noyaux ovoïdes (10-15 μ) sont situés dans toutes les cellules à une même distance de la base: leur chromatine y est répartie en mottes denses et ils possèdent un ou deux nucléoles.

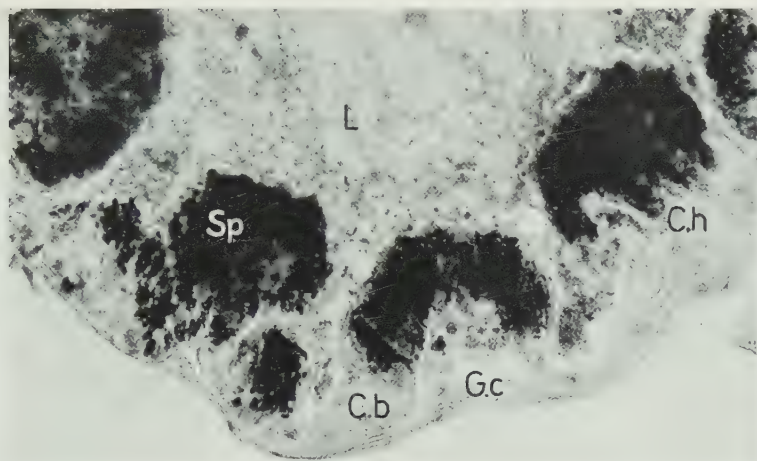


Fig. 1. Section transversale de la poche antérieure (Carnoy). Substitution des anions à l'argent (Méthode de Von Kossa). Remarquez la grande abondance des sphérocristaux dans la région apicale des cellules hautes *Ch* et l'absence de sphérocristaux optiquement décelables dans les cellules basses *Cb*. *Gc* gaine conjonctive. *L* lumière. $\times 300$

La membrane plasmique basale constitue de nombreuses invaginations orientées parallèlement à l'axe cellulaire et atteignant la région nucléaire. Les espaces intercellulaires mesurent $200 \text{ \AA}$ en moyenne et contiennent un matériel transparent aux électrons. Par endroit, des mitochondries s'accrochent aux membranes (fig. 4b) réalisant un système analogue au complexe « mitochondries—zone d'adhésion » décrit par Noirot-Thimothee et Noirot (1967) dans les régions latérales du rectum de *Cephalothermes*. La longueur de ces formations atteint $0,3$ à $0,4 \mu$. L'espace intercellulaire s'élargit ($400 \text{ \AA}$) et contient un matériel légèrement granuleux; l'espace mitochondrie—membrane est de $400 \text{ \AA}$ environ et le matériel filamentueux situé entre les deux organites est peu abondant. Les mitochondries associées à ces complexes ont une matrice opaque aux électrons et des crêtes sans orientation préférentielle. De plus le reticulum endoplasmique peut être situé à proximité des invaginations basales qui donnent fréquemment naissance à des vésicules de pinocytose.

Les membranes plasmiques latérales sont assez rectilignes. Dans la région basale elles forment quelques complexes « mitochondries—zone d'adhésion » et des vésicules de pinocytose (fig. 4a); l'espace intercellulaire est transparent et constamment étroit. Vers l'apex les membranes sont unies par des desmosomes cloisonnés discontinus (fig. 8) et se joignent en une *zonula adherens* assez courte située à la base des feuillet apicaux.

Dans la région apicale, la membrane plasmique, revêtue, forme des feuillet comparables à ceux décrits par Gupta et Berridge (1966) dans les papilles rectales de *Calliphora*. Moins réguliers et moins nombreux que chez ce Diptère, ces replis (fig. 2) sont séparés par des espaces étroits (150 à $200 \text{ \AA}$) et ont une épaisseur variant de 400 à $900 \text{ \AA}$. Le revêtement externe est beaucoup moins dense et beaucoup moins structuré que le revêtement interne qui est formé de corpuscules de

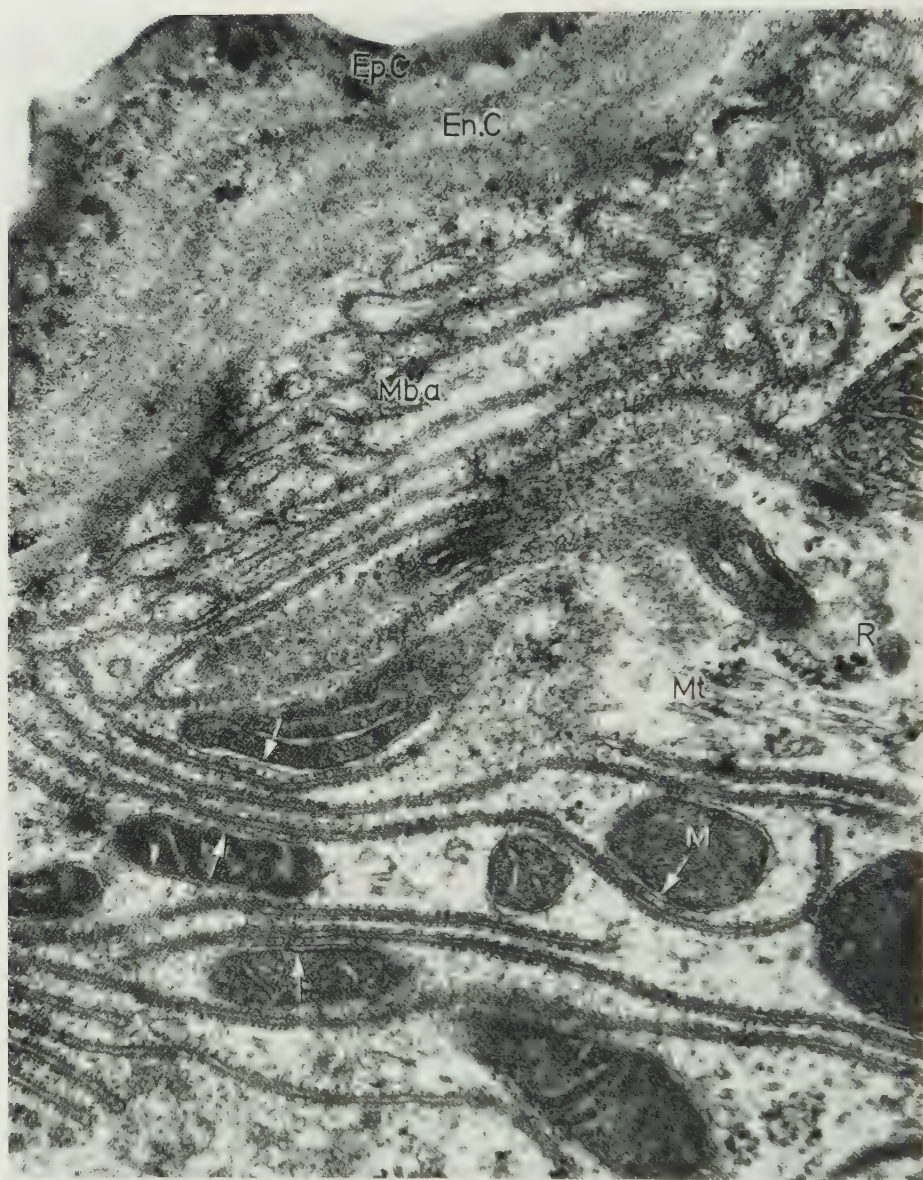


Fig. 2. Région apicale (glutaraldéhyde-osmium). La membrane plasmique *Mb a* forme des feuillets apicaux à membranes revêtues associées à des mitochondries *M* (flèches). La couche sous-cuticulaire est virtuelle, la cuticule formée d'une épicuticule *Ep C* et d'une endocuticule *En C* fine. *R* ribosomes, *Mt* microtubules. $\times 62400$

100 à 150 Å de hauteur. Les mitochondries associées à ces membranes revêtues (Noirot et Noirot-Thimothée, 1966) sont assez clairsemées et situées à une distance de 160 à 240 Å des membranes cytoplasmiques: leur matrice est opaque aux

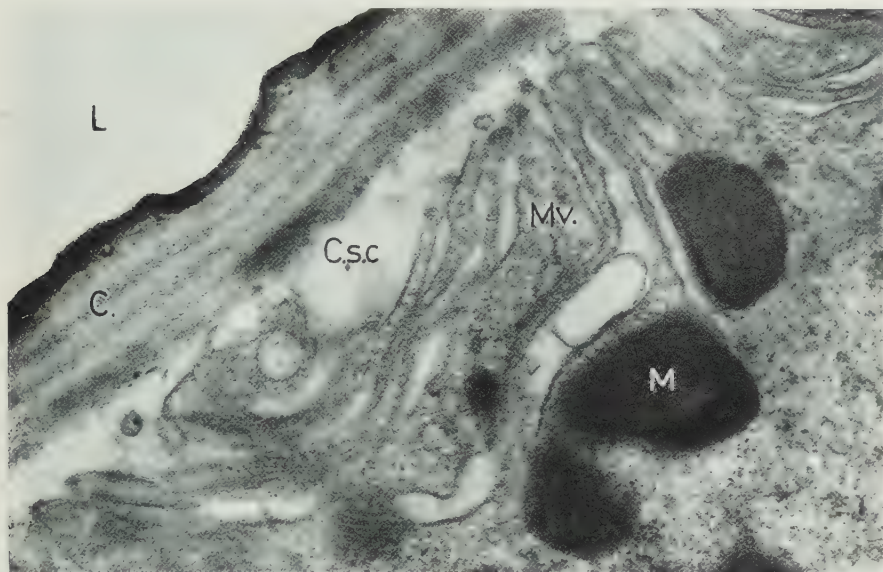


Fig. 3. Région apicale (glutaraldéhyde-osmium). Aspect moins fréquemment observé: la couche sous-cuticulaire *Cs c* existe; la membrane plasmique, non revêtue, forme des microvilli *Mv*; les mitochondries *M* sont proches des membranes. *L* lumière de l'iléon, *C* cuticule. $\times 33600$

électrons, les crêtes sans orientation préférentielle et l'espace entre les deux membranes mitochondriales est assez étroit (100 Å). Cet aspect, de loin le plus fréquent, caractérise les régions où la couche sous-cuticulaire est virtuelle. Dans d'autres régions, cette couche transparente aux électrons atteint 0,2 μ de hauteur (fig. 3): elle contient quelques inclusions sphériques très denses identiques à celles de la lame basale. Les feuilletts apicaux peuvent rester très proches les uns des autres ou être séparés par un espace atteignant 0,15 μ . L'épaisseur des replis reste identique, des mitochondries sont encore associées aux membranes, mais celles-ci présentent un revêtement moins dense qui donne à l'ensemble l'aspect de microvilli. On observe dans ce cas quelques vésicules à la base des replis. La cuticule (fig. 2, 3), fine (0,4 à 0,8 μ) comporte une endocuticle¹ (3000 à 6000 Å) formée de quelques lamelles granulo-fibreuses sans canaux poraires et une épicuticule (800 à 1200 Å) constituée elle-même d'une fine cuticuline et d'une couche dense traversée de filaments épicuticulaires (diamètre 155 Å) et terminée vers l'endocuticule par des masses ovoïdes plus volumineuses. Il n'existe pas de dépressions épicuticulaires, mais seulement quelques épines.

Le reticulum endoplasmique et les concrétions minérales représentent les constituants cytoplasmiques essentiels de cet épithélium. Tandis que certaines cellules sont très riches en ergastoplasme, d'autres contiennent surtout des sphérules, accumulés dans la partie supra-nucléaire ou dans tout le cytoplasme. Le reticulum endoplasmique peut former des citernes arrondies au contenu trans-

1 Selon la terminologie de Noirot et Noirot-Thimothée (1969).

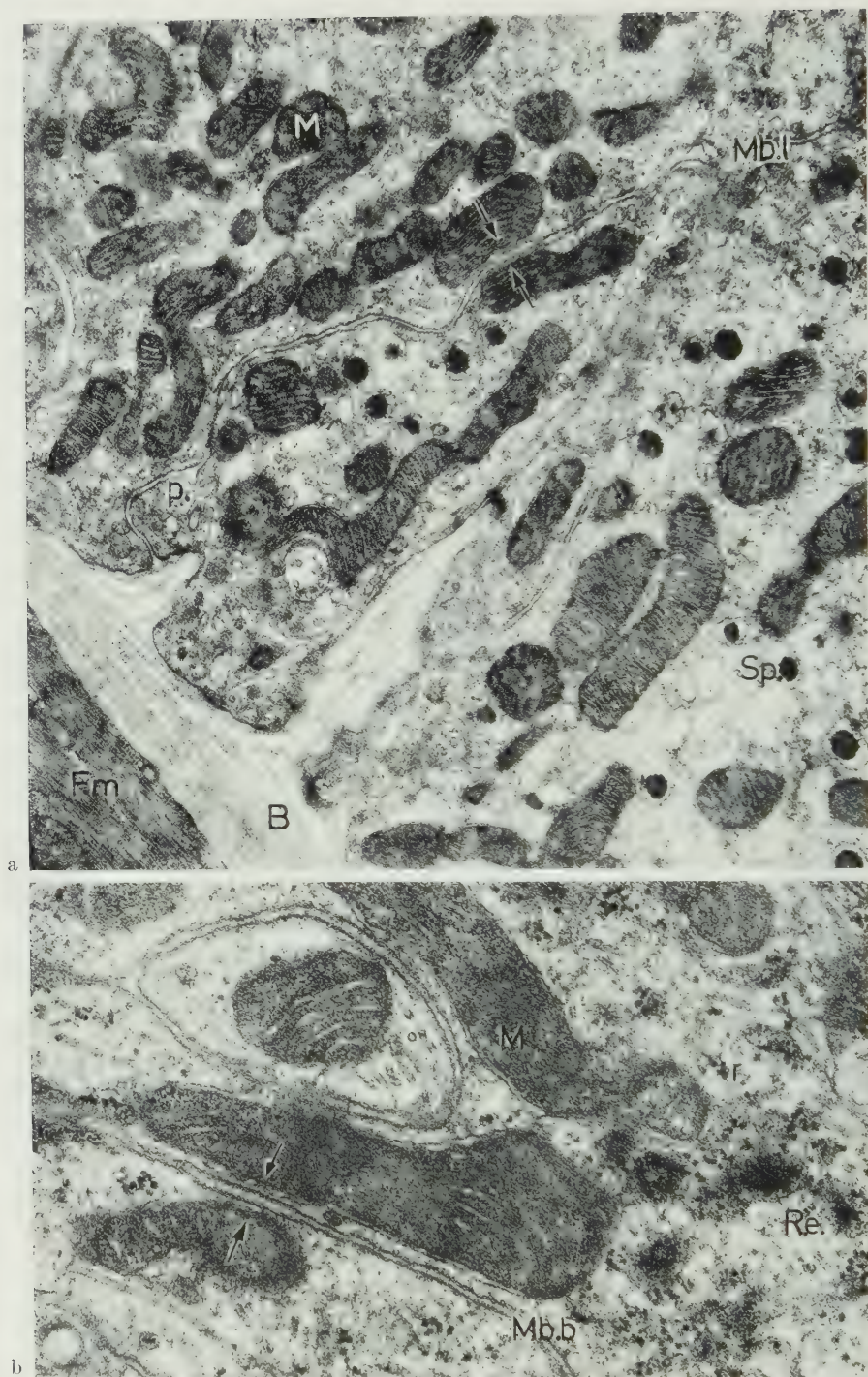


Fig. 4a et b

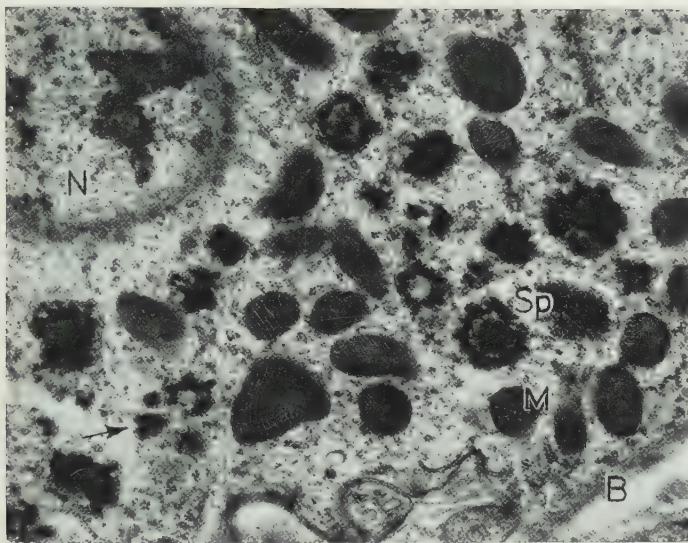


Fig. 5. Région basale. Premiers stades de formation des sphérocristaux *Sp*. Les sels minéraux s'accumulent dans les citernes ergastoplasmiques (flèches), puis s'organisent en strates concentriques. Remarquez les pores nucléaires du noyau *N* et l'abondance de ribosomes libres *R* et des mitochondries *M*. *B* lame basale. $\times 21400$

parent ou opaque aux électrons (fig. 4a, b, 5): le matériel opaque peut être soit dispersé soit organisé en formations sphériques de $0,2\mu$ de diamètre. Dans des citernes plus volumineuses, un *nucleus* opaque est séparé d'une couche périphérique elle-même opaque par une strate médiane transparente (fig. 5). Les sphérules, limités par une membrane agranulaire sont formés de strates concentriques alternativement opaques et transparentes aux électrons dont le nombre et l'épaisseur varient d'une concrétion à l'autre (fig. 6a, b). Les couches sombres sont composées d'un matériel d'opacité variable tandis que les couches transparentes, souvent fines, contiennent un stroma réticulé. La membrane agranulaire qui entoure les concrétions est parfois plissée et peut englober des figures myéliniques (fig. 7) qui s'accolent au sphérule. De nombreuses concrétions ont un diamètre de 1 à 2μ , certaines peuvent atteindre 5μ , et leur contour irrégulier est dû à la confluence d'inclusions plus petites (fig. 6b) dont seules les couches externes sont communes. Quelle que soit leur taille, les inclusions ne sont pas biréfringentes et nécessitent,

Fig. 4a et b. Région basale (glutaraldéhyde-osmium). a, La lame basale *B* suit les replis épithéliaux mais ne pénètre jamais dans les espaces intercellulaires. Les mitochondries sont nombreuses et peuvent s'associer aux membranes latérales *Mb l* pour former des complexes « mitochondries—zones d'adhésion » (flèches). Remarquer les sphérocristaux intraergastoplasmiques de petite taille *Sp*. *Vp* vésicule de pinocytose. *F m* fibres musculaires. $\times 21200$. b, détail. Les invaginations basales *Mb b* forment elles aussi des complexes « mitochondries—zones d'adhésion » (flèches). Remarquez les premiers stades d'accumulation dans le reticulum endoplasmique *Re*. *R* ribosomes. $\times 50000$

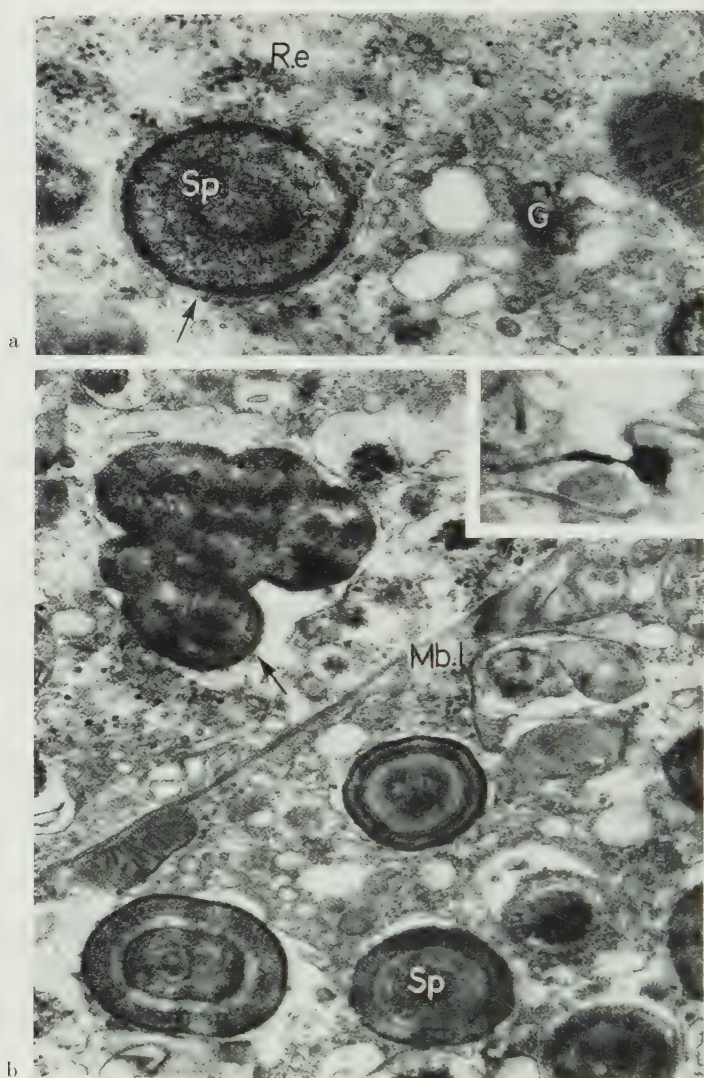


Fig. 6. a, Sphérocristal stratifié *Sp* (glutaraldéhyde-osmium). La membrane qui l'entoure se dégranule (flèche). L'appareil de Golgi *G* peu fréquent, est ici représenté par quelques saccules et vésicules. *Re* réticulum endoplasmique. $\times 46\,600$. b, Sphérocristaux. La fixation (paraformaldéhyde-glutaraldéhyde) n'est pas favorable au cytoplasme mais les concrétions *Sp*, de grande taille et stratifiées, se coupent mieux. Remarquez une grosse concrétion (flèche) formée par coalescence de sphérocristaux plus petits. $\times 16\,600$. Encart, même fixation permettant de voir du matériel opaque aux électrons dans l'espace intercellulaire. $\times 29\,200$

pour être mises en évidence à l'échelle photonique, l'emploi de méthodes cytochimiques (fig. 1). Ces méthodes ne permettent d'ailleurs de déceler que les gros sphérules: aussi donnent-elles des résultats négatifs dans les cellules basses de la

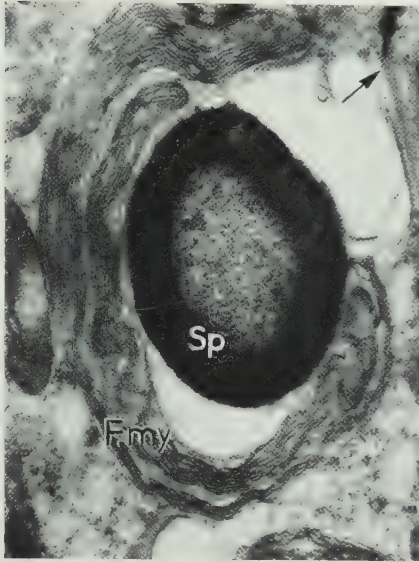


Fig. 7. Sphérocristal (paraformaldéhyde-glutaraldéhyde). Sphérocristal stratifié *Sp* entouré par une figure myélinique *F my*. Remarquez le matériel opaque aux électrons dans un espace intercellulaire (flèche). $\times 29\,200$

poche antérieure, où il n'existe que des sphérules dont la taille est inférieure au pouvoir de résolution du microscope photonique.

Les autres organites et inclusions offrent peu de particularités notables : riche en ribosomes libres et en glycogène, le hyaloplasme contient quelques dictyosomes (fig. 6a), quelques vésicules revêtues et des microtubules. Ces derniers sont soit dispersés, soit groupés parallèlement à l'axe cellulaire, surtout dans les régions apicale et basale ; ils sont particulièrement nombreux dans les cellules basses de la poche antérieure de l'iléon (fig. 8).

Des concrétions sont dispersées dans la substance fondamentale de la gaine conjonctivo-musculaire sous jacente à l'épithélium : très comparables aux sphérules intracytoplasmiques, ces concrétions sont stratifiées, peuvent atteindre $2\,\mu$ mais sont dépourvues de membrane limitante.

2. Caractères cytochimiques et analyse ionique des concrétions

Les sphérules sont constitués d'un stroma organique de nature glyco-protéique (tableau 1) et d'une grande quantité d'éléments minéraux. En microscopie photonique, la recherche globale des anions (Von Kossa, Stoelzner) s'est avérée positive, celle des urates (Gomori, Schmorl) et celle des carbonates (Bunting), négative. Les méthodes de détections des cations Ca, Mg et K (Mac Gee Russel) ou du magnésium seul (Broda) donnent des résultats positifs, celles du potassium (Macallum), des résultats négatifs. Le fer est révélaible sous forme ferrique (Perls). Les méthodes cytochimiques appliquées aux ultrastructures ont révélé des anions et des cations sur les strates opaques aux électrons après double fixation.

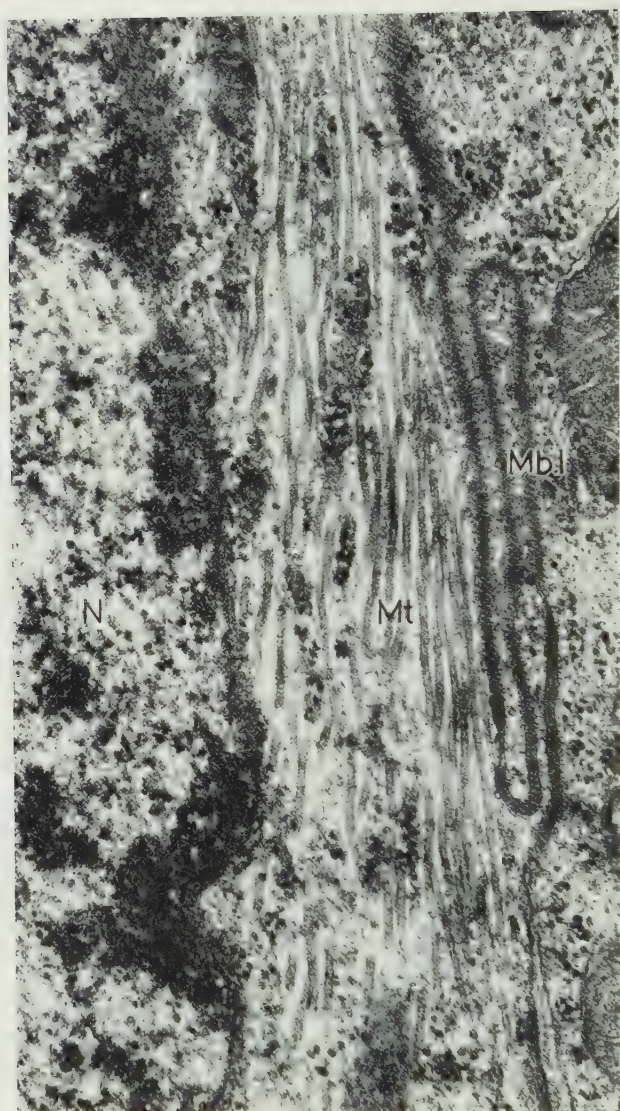


Fig. 8. Détail de la région nucléaire dans une cellule basse de la poche antérieure (glutaral-déhyde-osmium). Les microtubules *Mt* sont nombreux et orientés parallèlement à l'axe cellulaire. Les membranes latérales *Mb l* sont unies par des desmosomes septaux dans la région apicale. *N* noyau. $\times 51000$

L'analyse ionique a permis de détecter du calcium, du magnésium, du potassium, du fer, du phosphore, un peu de chlore, et parfois des traces de sodium. L'hydrate de pipérazine n'élimine aucun atome, alors que l'eau nitrique extrait totalement le calcium, le magnésium, le potassium, le chlore et le fer, et partiellement le phosphore.

Tableau 1

Méthodes	Composés recherchés	Résultats
A. P. S.	glyco-protéines	+
Bleu Alcian	MPSA	+
Bleu Alcian ph 0,5	MPSA sulfatés	—
Metachromasie	MPSA	—
Alloxane-Schiff	protides à groupements NH ₂	+
Tetrazoréaction	Amino acides	—
Von Kossa	divers anions	+
Stoelzner	divers anions	+
Alizarine	Ca, Mg, K	+
Jaune Titan	Mg	+
Cobalt hexanitrite	K	—
Bleu de Turnbull	Fe ⁺⁺	—
Bleu de Prusse	Fe ⁺⁺⁺	+
Gomori	acide urique	—
Schmorl	composés réducteurs	—
Bunting	carbonates	—
Microanalyse	Ca, Mg, Fe, K, P, Cl	+
	Na	traces
	Ba, Cu, Mn, Zn	—
Microanalyse après traitement à l'hydrate de piperazine	Ca, Mg, Fe, K, P, Cl	+
Microanalyse après traitement à l'eau nitrique	Ca, Mg, Fe, Cl	—
	P	disparition partielle

L'ensemble de ces résultats montre que les concrétions intracytoplasmiques sont essentiellement composées de calcium, de magnésium, de potassium et de fer : certains de ces cations existent sous forme de phosphates ou de chlorures, mais la présence d'autres anions n'est pas exclue.

Discussion

Chez *Blatella*, les cellules de la paroi de l'iléon sont caractérisées essentiellement par des différenciations de la membrane plasmique et par la présence de concrétions minérales intracytoplasmiques.

Si les données de la microscopie photonique suggèrent l'existence de deux types cellulaires, certaines cellules « basses » étant dépourvues de concrétions minérales histochimiquement décelables, l'observation en microscopie électronique révèle que ces cellules contiennent de petits sphérules intracytoplasmiques et possèdent les mêmes différenciations membranaires que les cellules hautes. Particulièrement riches en microtubules, les cellules basses remplissent peut-être, par ailleurs, un rôle de soutien mais cette spécialisation paraît de peu d'importance : il y aurait donc lieu d'envisager l'existence d'un type cellulaire unique. Jarial et Scudder (1970) décrivent deux types cellulaires dans l'iléon de *Cenocoria*, mais

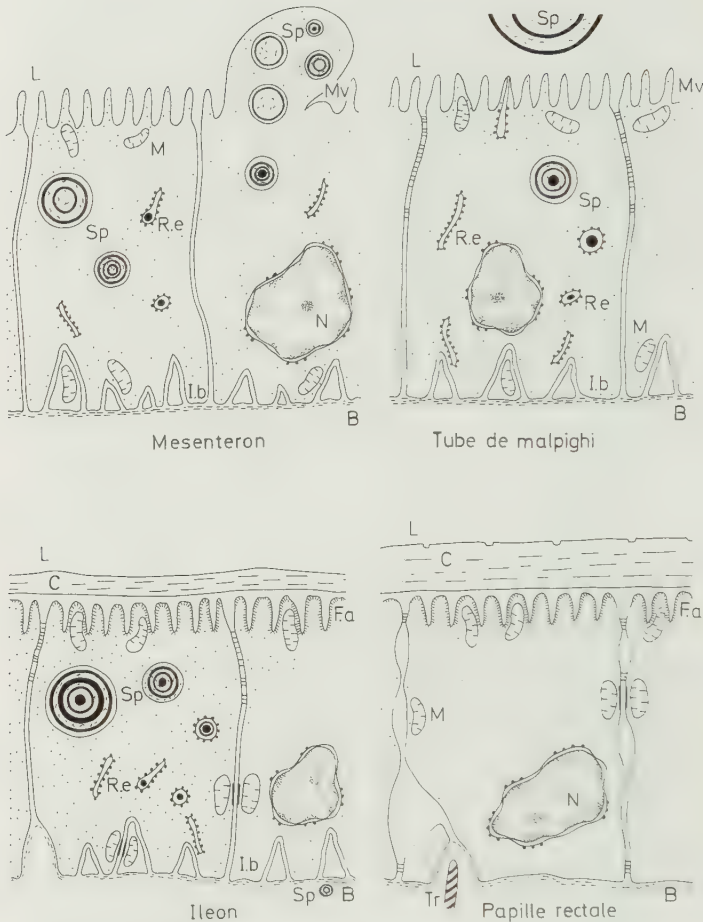


Fig. 9. Schémas comparatifs de structures de différents épithélium pouvant intervenir dans l'accumulation minérale et (ou) la régulation ionique. 1 Mesenteron (d'après Gouranton, Cercopides et Jeantet, *Formica*). 2 Tubes de Malpighi (modifié d'après Berkaloff, *Gryllus*, Wigglesworth et Salpeter, *Rhodnius*). 3 Iléon (*Blatella*). 4 Papilles rectales (d'après Hopkins, *Aedes*, Noirot et Noirot-Thimothée, *Cephalothermes*, Berridge et Gupta, *Calliphora*). B lame basale. C cuticule. Fa feuillets apicaux. Ib invaginations basales. L lumière. M mitochondries. Mv microvillosités. N noyau. Re reticulum endoplasmique. Sp sphérocrystal. Tr trachée

il faut noter que cet Insecte ne possède pas de papilles rectales et que l'iléon est assimilable à un véritable rectum. Le cas de *Blatella* est, au contraire, à rapprocher de celui des Acridiens *Ailoppus* (Baccetti, 1960) et *Locusta* (Aubry, 1971) où un type cellulaire unique est décrit dans la paroi de l'iléon; et s'oppose à ce qui a été signalé chez *Lepismodes* (Noirot et Noirot-Thimothée, 1971).

La coexistence de plusieurs catégories de différenciations membranaires dans les cellules épithéliales de l'iléon constitue un fait original (fig. 9). Ces cellules possèdent, en effet, des différenciations de la membrane plasmique à la fois dans les régions basale, latérale et apicale. Les invaginations basales, bien développées,

sont comparables à celles de l'iléon de *Ailoppus* (Baccetti, 1960) et de *Locusta* (Aubry, 1971); elles rappellent également celles d'autres organes: tubes de Malpighi (*Gryllus*, Berkaloff, 1960; *Calliphora*, Berridge et Oschman, 1969; *Gryllotalpa*, Lhonoré, 1971) et mesenteron (*Formica*, Jeantet, 1971; *Drosophila*, Filshie, Poulson et Waterhouse, 1971). Les différenciations des membranes latérales (complexes «mitochondries—zone d'adhésion») et les espaces intercellulaires peuvent par contre être comparés à des structures de type «rectal» (*Cephalothermes*, Noirot et Noirot-Thimothée, 1967). Enfin l'apex est également très comparable à celui des papilles rectales d'autres Insectes; il est constitué de feuillets apicaux à membranes revêtues, associées à des mitochondries (Gupta et Berridge, 1966a; Noirot et Noirot-Thimothée, 1966; Strambi et Zylberberg, 1967; Oschman, et Wall, 1969). Ce dernier aspect morphologique est peut-être assez courant dans l'iléon: des replis apicaux sont en effet observés par Baccetti (1960) chez *Ailoppus* et les micrographies de Aubry (1971) montrent des feuillets tout à fait caractéristiques dans l'iléon de *Locusta*. Ces différenciations n'existent pas chez *Lepismodes* (Noirot et Noirot-Thimothée, 1971). Par ailleurs, la cuticule qui recouvre les feuillets apicaux est assez différente de celle décrite chez *Ailoppus* (Baccetti, 1960): beaucoup plus mince, elle est dépourvue de dépressions épicuticulaires.

La présence de concrétions intracytoplasmiques constitue le deuxième caractère remarquable de ce segment proctodéal. L'accumulation de sels minéraux, sous forme de concrétions, est assez fréquente dans l'iléon des Orthoptères et des Dictyoptères; elle a en effet été signalée chez *Ailoppus* (Baccetti, 1960) et chez *Periplaneta* (Srivastava et Gupta, 1961) et nous l'avons retrouvé chez *Locusta* et *Blabera* (Ballan-Dufrançais et Martoja, 1971; Ballan-Dufrançais, en cours). Elle est particulièrement importante chez *Blatella*.

L'origine ergastoplasmique des concrétions, pressentie par André et Fauré-Fremiet (1967) chez un Protiste, paraît être générale chez les Insectes. Elle a été démontrée par Gouranton (1968) dans le mesenteron de Cercopides et a, par la suite, été mise en évidence dans divers organes: glandes annexes (*Blatella*, Ballan-Dufrançais, 1970; *Formica*, Jeantet, sous presse), tubes de Malpighi (*Blatella*, *Gryllus*, Ballan-Dufrançais, inédit), hypoderme (*Ephippiger*, Ballan-Dufrançais, inédit). Le mode de formation des cristaux chez *Blatella* est comparable à celui qui a été décrit chez les Cercopides (Gouranton, 1968) ou chez la Fourmi (Jeantet, 1971): les sels précipitent tout d'abord sans organisation apparente dans les citernes ergastoplasmiques, puis constituent un *nucleus* sphérique. La membrane du reticulum endoplasmique perd progressivement son revêtement de ribosomes, mais persiste autour du sphérule qui s'accroît par addition de strates périphériques. D'autres hypothèses ont été émises quant à l'origine des concrétions intracytoplasmiques. Ainsi Berkaloff (1960), puis Lavallard (1967) décrivent des «vacuoles à concrétions»: toutefois les premiers stades de la formation des sphérules n'ont pas été observés et il semble bien que ces vacuoles à concrétions soient en fait des citernes du réticulum dégranulées. Pour Wigglesworth et Salpeter (1962), les concrétions ont une origine mitochondriale: les structures interprétées par ces auteurs comme des stades intermédiaires dans la transformation de mitochondries en concrétions paraissent être des figures myéliniques comme il en existe dans le mesenteron (Gouranton, 1968) ou l'iléon de *Blatella*; la présence d'éléments minéraux dans les mitochondries est bien connue (voir Rouiller, 1960) mais il ne semble pas que des sphérules puissent s'y former, au moins chez les Insectes.

Enfin l'hypothèse d'une origine golgienne a également été proposée (hépatopancréas d'Escargot, Abolins-Krogis, 1970); celle-ci peut difficilement être retenue puisque les «vésicules golgiennes» décrites sont comparées par l'auteur même à des «round bodies with rough surfaced membranes». Ainsi, l'origine réticulaire des concrétions intracytoplasmiques paraît bien établie. En ce qui concerne les sphérocristaux inter- et extracellulaires, leur mode de formation a été étudié, par Graf (1971), chez un Crustacé, où les dépôts minéraux se forment au contact de la membrane plasmique. Dans la gaine conjonctivo-musculaire de l'iléon de *Blatella* l'origine des concrétions n'a pas été élucidée.

La nature minérale des inclusions a été déterminée par analyse par spectrographie des rayons X et par cytochimie. Les sphérocristaux sont essentiellement constitués de phosphates de calcium et de magnésium, et contiennent également du chlore, du potassium, du fer et des traces de sodium. Les cations sont très abondants mais moins variés qu'à d'autres niveaux du tube digestif (Gouranton, 1968; Ballan-Dufrançais et Martoja, 1971; Ballan-Dufrançais, Jeantet et Martoja, 1971): le manganèse, le cuivre ou le baryum n'y sont pas détectés par microanalyse.

La recherche des urates par les méthodes cytochimiques a donné des résultats négatifs au niveau des sphérocristaux de l'iléon de *Blatella*. Par contre, dans l'iléon de *Periplaneta*, Srivastava et Gupta (1960) font état de résultats positifs: différents contrôles permettent de penser que la pigmentation naturelle de certains cristaux pourrait, dans ce cas, être à l'origine d'une erreur d'interprétation. Baccetti (1960) envisage également la présence d'urates dans l'iléon d'*Ailopopus* en se fondant exclusivement sur l'aspect morphologique des cristaux qu'il compare à ceux des tubes de Malpighi de *Gryllus*. Selon l'auteur, des urates seraient localisés dans les strates transparentes aux électrons. Les observations de Gouranton (1968), Petit (1970), Jeantet (1971), Cantacuzène et Martoja (1972), montrent que la présence de telles strates ne permet en aucun cas de définir un urosphérite. Dans l'iléon de *Blatella*, les strates transparentes aux électrons semblent correspondre aux couches de glycoprotéines et les strates opaques sont particulièrement riches en sels minéraux.

En raison de ses caractères morphologiques, l'iléon a été comparé à divers organes dont, par ailleurs, la physiologie est connue: papilles rectales, tubes de Malpighi, mesenteron (fig. 9). De nombreux travaux (Phillips, 1964; Gupta et Berridge, 1966b; Berridge et Gupta, 1967; Hopkins, 1967; Oschman et Wall, 1969; Wall et Oschman, 1970) montrent qu'au niveau des papilles rectales, se produit une réabsorption d'eau et d'ions provenant du fluide malpighien ou du bol alimentaire. Cette réabsorption est due à un transport actif de potassium et de sodium, entraînant une diffusion passive d'eau et éventuellement d'autres ions. Ces différentes substances traversent la cuticule, plus particulièrement au niveau des dépressions épicuticulaires (Noirot et Bayon, 1969), puis la membrane plasmique différenciée en feuillets apicaux, elles passent dans les espaces intercellulaires élargis et dans les sinus, puis gagnent l'hémolymphe. Dans les tubes de Malpighi, le fluide est excrété de l'hémolymphe vers la lumière (Ramsay, 1956; Berridge, 1968, 1969) et cette excrétion serait favorisée par le développement des membranes et leur association avec des mitochondries (Berridge et Oschman, 1969). Le reticulum interviendrait également dans le transit de substances, en accumulant des

sels sous forme de concrétions qui sont ensuite rejetées dans la lumière (Lhonoré, 1971). Le mesenteron contient fréquemment des sels minéraux, mais ceux-ci ne peuvent être mis en évidence par les méthodes cytochimiques que lorsqu'ils constituent des concrétions (Ballan-Dufrançais, Jeantet et Martoja, 1971). Lorsque de telles concrétions existent, elles sont rejetées dans la lumière selon un processus d'extrusion apocrine (Jeantet, 1971) et, comme dans les tubes de Malpighi, il y a donc accumulation temporaire. Bowen (1950) considère que cette accumulation pourrait être due à une absorption par la surface apicale d'ions en excès dans la lumière du mesenteron.

Dans l'iléon de *Blatella*, l'accumulation de sels minéraux est très importante puisque la plupart des cellules épithéliales contiennent des concrétions dans toute la zone apicale ou même dans tout le volume cytoplasmique. Ces concrétions restent toujours très opaques, et il ne semble pas qu'il puisse y avoir une redissolution de sels minéraux comparable à celle qui est signalée dans le cas des Cercopides (Gouranton, 1968). D'autre part, l'hypothèse d'une extrusion des cristaux par la base des cellules paraît douteuse (Baccetti, 1960); enfin, il est probable que la cuticule s'oppose à une extrusion apicale. Les sphérocristaux persisteraient donc dans la paroi de l'iléon jusqu'à la mort de l'animal. Ce segment proctodéal constitue, comme les tubes de Malpighi ou le mesenteron, un important organe d'excrétion par accumulation. Cependant, dans le cas de l'iléon, cette accumulation serait définitive.

L'iléon n'a jusqu'ici donné lieu à aucune étude physiologique. Toutefois, Ramsay (1955) constate que, chez *Dixippus*, le fluide intestinal est, au niveau de l'iléon, moins riche en eau et potassium que le fluide malpighien. La présence d'urates cristallisés dans la lumière de l'iléon suggère qu'il pourrait y avoir une réabsorption au niveau de cet organe. En effet, les urates sont excrétés par les tubes de Malpighi sous forme de sels solubles et leur cristallisation entre la paroi de l'iléon et la membrane péritrophique pourrait indiquer l'existence à ce niveau d'une réabsorption d'eau et de potassium. La présence de différenciations membranaires apicales dans les cellules de l'iléon est également favorable à cette hypothèse. L'accumulation de sels minéraux dans les cellules épithéliales pourrait être due à une réabsorption par l'apex cellulaire des phosphates en excès, comme dans le mesenteron, ou correspondre à une épuration du milieu intérieur au travers des invaginations basales, comme dans les tubes de Malpighi. Il n'est pas possible de choisir entre ces deux hypothèses sur la base des seules données morphologiques, mais il est certain que l'iléon qui accumule des sels minéraux est également le siège de transit et, qu'à ce titre, il devrait être pris en considération lors d'études physiologiques.

Bibliographie

- Abolins-Krogis, A.: Electron microscope studies of the intracellular origin and formation of calcifying granules and calcium spherites in the hepato-pancreas of the snail *Helix pomatia* L. *Z. Zellforsch.* **108**, 501—515 (1970).
- André, J., Fauré-Fremiet, E.: Formation et structure des concrétions calcaires chez *Prorodon morgani* Kahl. *J. Microscopie* **6**, 391—398 (1967).
- Aubry, R.: Morphologie de l'intestin postérieur de *Locusta migratoria*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **272**, 1992—2000 (1971).
- Baccetti, B.: Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti. I. L'ileo di un Ortottero adulto. *Redia* **45**, 263—278 (1960).

- Ballan-Dufrançais, C.: Données morphologiques et histologiques sur les glandes annexes mâles et le spermatophore de *Blatella germanica* L., au cours de la vie imaginale. Bull. Soc. zool. France **93**, 401—423 (1968).
- Ballan-Dufrançais, C.: Données cytophysiologiques sur un organe excréteur particulier d'un insecte, *Blatella germanica* L. (Dictyoptère). Z. Zellforsch. **109**, 336—355 (1970).
- Ballan-Dufrançais, C., Jeantet, A. Y., Martoja, R.: Composition ionique et signification physiologiques des accumulations minérales de l'intestin moyen des Insectes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **273**, 173—176 (1971).
- Ballan-Dufrançais, C., Martoja, R.: Analyse chimique d'inclusions minérales par spectrographie des rayons X et par cytochimie. Application à quelques organes d'insectes Orthoptères. J. Microscopie **II**, 219—248 (1971).
- Berkaloff, A.: Contribution à l'étude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les Insectes. Thèse. Ann. Sci. Nat. (Zool.) **12**^e ser. 869—947 (1961).
- Berridge, M. J.: Urine formation by the Malpighian tubules of *Calliphora*. I. Cations. J. exp. Biol. **48**, 159—174 (1968).
- Berridge, M. J.: Urine formation by the Malpighian tubules of *Calliphora*. II. Anions. J. exp. Biol. **50**, 15—28 (1969).
- Berridge, M. J., Gupta, B. L.: Fine structural changes in relation to ion and water transport in the rectal papillae of the blowfly *Calliphora*. J. Cell Sci. **2**, 69—112 (1967).
- Berridge, M. J., Oschman, J. L.: A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. Tissue and Cell **I**, 247—272 (1969).
- Bowen, V. I.: Manganese metabolism of Social Vespidae. J. exp. Zool. **115**, 175—205 (1950).
- Bulger, R. E.: Use of potassium pyroantimonate in the localization of sodium ions in rat kidney tissue. J. Cell Biol. **40**, 79—94 (1969).
- Cantacuzène, A. M., Martoja, R.: Origine des enclaves vitellines de l'oocyte d'un Insecte Thysanoure, *Petrobius maritimus*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **273**, 1723—1726 (1972).
- Carasso, N., Favard, P.: Mise en évidence du calcium dans les myonèmes pédonculaires de Ciliés Péritriches. J. Microscopie **5**, 759—770 (1966).
- Filshie, B. K., Poulson, D. F., Waterhouse, D. F.: Ultrastructure of the copper accumulating region of *Drosophila* larval midgut. Tissue and Cell **3**, 77—102 (1971).
- Gouranton, J.: Composition, structure, et mode de formation des concrétions minérales de l'intestin moyen des Homoptères Cercopides. J. Cell Biol. **37**, 316—328 (1968).
- Graf, F.: Dynamique du calcium dans l'épithélium des caecums postérieurs d'*Orchestia carimana* Heller (Crustacé, Amphipode). Rôle de l'espace intercellulaire. C. R. Acad. Sci. (Paris) **273**, 1828—1831 (1971).
- Gupta, B. L., Berridge, M. J.: A coat of repeating subunits on the cytoplasmic surface of the plasma membrane in the rectal papillae of the blowfly *Calliphora erythrocephala* Meig. studied in situ by electron microscopy. J. Cell Biol. **29**, 376—382 (1966a).
- Gupta, B. L., Berridge, M. J.: Fine structural organization of the rectum in the blowfly *Calliphora erythrocephala* Meig. with special reference to connective tissue, tracheae and neurosecretory innervation in the rectal papillae. J. Morph. **120**, 23—81 (1966b).
- Hopkins, C. R.: The fine structural changes observed in the rectal papillae of the mosquito *Aedes aegypti* L. and their relation to the epithelial transport of water and inorganic ions. J. roy. micr. Soc. **86**, 235—252 (1967).
- Jarial, M. S., Scudder, G. G. E.: The morphology and ultrastructure of the Malpighian tubules and Hindgut in *Encorixia bifida* (Hung.) (Hémiptera, Corixidae). Z. Morph. Tiere **68**, 269—299 (1970).
- Jeantet, A. Y.: Recherches histophysiologiques sur le développement postembryonnaire et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). II. Particularités histochimiques et ultrastructurales de l'intestin moyen de *Formica polyctena* Foerst. Z. Zellforsch. **116**, 405—424 (1971).
- Jeantet, A. Y.: III. Données cytophysiologiques sur les glandes annexes mâles de *Formica polyctena* Foerst. Ann. Sci. Nat. (Zool.) (sous presse).
- Karnovsky, M. J.: A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. **27**, 137A—138A (1965).
- Komnick, M.: Elektronenmikroskopische Lokalisation von Na⁺ und Cl⁺ in Zellen und Geweben. Protoplasma (Wien) **52**, 414—418 (1962).

- Lavallard, R.: Ultrastructure des cellules prismatiques de l'épithélium intestinal chez *Peripatus acacioi* Marcus et Marcus. C. R. Acad. Sci. (Paris) **264**, 929—932 (1967).
- Lhonoré, J.: Données cytophysiologiques sur les tubes de Malpighi de *Gryllotalpa gryllotalpa* Latr. (Orthoptère, Gryllotalpidae). C. R. Acad. Sci. (Paris) **272**, 2788—2791 (1971).
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M.: Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris: Masson ed. 1967.
- Noirot, C., Bayon, C.: La cuticule proctodéale des Insectes: mise en évidence de «dépressions épicuticulaires» par le microscope électronique à balayage. C. R. Acad. Sci. (Paris) **269**, 996—999 (1969).
- Noirot, C., Noirot-Thimotheé, C.: Revêtement de la membrane cytoplasmique et absorption des ions dans les papilles rectales d'un termite (Insecta Isoptera). C. R. Acad. Sci. (Paris) **263**, 1099—1102 (1966).
- Noirot, C., Noirot-Thimotheé, C.: La cuticule proctodéale des insectes. I. Ultrastructure comparée. Z. Zellforsch. **101**, 477—509 (1969).
- Noirot, C., Noirot-Thimotheé, C.: Ultrastructure du proctodeum chez le Thysanoure *Lepismodes inguilinus* Newman (= *Thermobia domestica* Packard). I. La région antérieure (Ileon et rectum). J. Ultrastruct. Res. **37**, 119—137 (1971).
- Noirot-Thimotheé, C., Noirot, C.: Liaison des mitochondries avec des zones d'adhésion intracellulaires. J. Microscopie **6**, 87—90 (1967).
- Nolte, A.: Elektronenmikroskopischer Nachweis und die Lokalisation von Natrium⁺ und Chloriden im proximalen Tubulusepithel der Rattenniere. Z. Zellforsch. **72**, 562—566 (1966).
- Oschman, J. L., Wall, B. J.: The structure of the rectal pads of *Periplaneta americana* L. with regard to fluid transport. J. Morph. **127**, 475—509 (1969).
- Petit, J.: Sur la nature et l'accumulation de substances minérales dans les ovocytes de *Polydesmus complanatus* L. (Myriapode, Diplopode). C. R. Acad. Sci. (Paris) **270**, 2107—2110 (1970).
- Phillips, J. E.: Rectal absorption in the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskal. I. Water—II. Sodium, potassium and chloride—III. The nature of the excretory process. J. exp. Biol. **41**, 15—67 (1964).
- Ramsay, J. A.: Excretion by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae): Calcium, magnesium, chloride, phosphate and hydrogen ions. J. exp. Biol. **33**, 697—708 (1956).
- Rouiller, C.: Physiological and pathological changes in mitochondrial morphology. Int. Rev. Cytol. **9**, 227—292 (1960).
- Srivastava, P. N., Gupta, P. D.: Excretion of uric acid in *Periplaneta americana* L. J. Insect. Physiol. **6**, 163—167 (1961).
- Strambi, C., Zylberberg, L.: Données morphologiques sur l'ampoule rectale de *Troglodorus bucheti gaveti* S. C. D. (Coléoptère, Bathysciinae). Ann. Sci. Nat. (Zool.) **9**, 529—548 (1967).
- Torack, R. M., La Valle, M.: The specificity of the pyroantimonate technique to demonstrate sodium. J. Histochem. Cytochem. **18**, 635—643 (1970).
- Wall, B. J., Oschman, J. L.: Water and solute uptake by rectal pads of *Periplaneta americana* L. Amer. J. Physiol. **218**, 1208—1215 (1970).
- Wigglesworth, V. B., Salpeter, M. M.: Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). J. Insect. Physiol. **8**, 299—307 (1962).

Christiane Ballan-Dufrançais
Laboratoire d'Histophysiologie des Insectes
Université Paris VI
12, rue Cuvier
F-75 Paris 5^e, France

